

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS CANNABINOIDES, ENDOCANNABINOIDES Y LA TEMOZOLAMIDA, SOLOS Y EN COMBINACIÓN SOBRE LA LINEA CELULAR GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G”

Tesis presentada por la Bachiller:
ROSAS ALARCÓN, Fabiola Delia.

Para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO.

Asesor:
Q.F DE LA FUENTE TORRES, Mocita.

**AREQUIPA-PERÚ
2015**

RESUMEN

Los cannabinoides han captado el interés de muchos científicos debido a sus numerosas actividades en el tratamiento antineoplásico farmacológico, es por ello que el presente estudio tuvo como finalidad demostrar el efecto citotóxico de los cannabinoides (WIN55,212-2 mesylate), endocannabinoides (anandamida) y temozolamida, solos y en combinación sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Para este propósito se realizaron ensayos previos; siendo el método del Ácido Bicinconínico (BCA) el empleado para determinar la concentración proteica de la línea celular, y así tener datos concretos para poder realizar la técnica analítica de Western Blot y evidenciar la presencia del receptor cannabinoide CB₁ el cual se expresa mediante la cantidad proteica del Glioblastoma Multiforme Humano T98G. Estas pruebas fueron necesarias para confirmar la veracidad de los resultados del ensayo de viabilidad celular con el que se determinó el efecto citotóxico.

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de School of Pharmaceutical Sciences de *Massachusetts College and Health Science University*. Boston, USA, donde se prepararon los cultivos celulares de Glioblastoma Multiforme Humano T98G, los cuales fueron usados para evaluar la concentración de proteínas, por el método ya descrito, y se manifestó que la línea celular empleada es un buen modelo farmacológico debido al alto contenido de proteínas encontrado.

Los cannabinoides son un grupo de compuestos presentes en la planta de Cannabis Sativa L. Ellos median sus efectos fisiológicos y de comportamiento mediante la activación de los receptores de cannabinoides específicos, por ello se realizó la técnica analítica de Western Blot para evaluar la presencia del receptor cannabinoide CB₁ en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G y se demostró que la anandamida y el WIN55,212-2 mesylate exhiben cierta selectividad por dicho receptor desempeñando un papel fundamental en la inducción de la muerte celular.

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizó una suspensión de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G, las cuales fueron sembradas en platos transparentes de crecimiento de 96 pozos a diferentes concentraciones con medio sin FBS. Las concentraciones aplicadas a las células de los compuestos estudiados fueron: Anandamida (0.5, 3 y 10 μ M), WIN 55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10 μ M) y Temozolamida (25, 50 y 100 μ M); en periodos de incubación de 12, 24 y 48 horas con el fin de demostrar el efecto citotóxico. Según los resultados obtenidos de los porcentajes de viabilidad se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Turkey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa con el grupo control.

Se pudo evidenciar la citotoxicidad y el potencial de acción antitumoral sinérgico de la temozolomida con cannabinoides y endocannabinoides. Se mostró cómo estas moléculas trabajan juntas para inhibir el crecimiento tumoral en las células gliales. La anandamida y el WIN55,212-2 mesylate a una concentración de 10 μ M con la temozolamida a 25 μ M ocasiona una reducción de la viabilidad celular (daño celular) cuando los receptores de cannabinoides se activan en Glioblastoma, es decir se inhibe eficazmente la viabilidad celular generando un sinergismo sobre la línea celular.

Estos resultados demuestran una nueva vía para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en el manejo de los gliomas malignos como Glioblastoma Multiforme (GBM).

Palabras Claves: cannabinoides, anandamida, WIN55,212-2 mesylate, temozolamida, receptor cannabinoide, tumor, cáncer, apoptosis.

ABSTRACT

Cannabinoids have caught the interest of many scientists due to their numerous pharmacological activities in cancer treatment in cell inhibition is therefore the present study aimed to demonstrate the cytotoxic effect of cannabinoids (WIN55,212-2 mesylate) endogenous cannabinoids (anandamide) and Temozolomide alone and in combination on T98G Human Glioblastoma cell line.

For this purpose, preliminary experiments were performed; being the method of bicinchoninic acid (BCA) used to determine the protein concentration of the cell line and thus have concrete data to perform the analytical technique of Western blot which shows the presence of the CB₁ cannabinoid receptor which is expressed by the protein amount of T98G Human Glioblastoma. These tests were needed to confirm the accuracy of the test results of cell viability with the cytotoxic effect was determined.

The research was conducted in the laboratories of School Pharmaceutical Sciences of Massachusetts College Health Science University. Boston, USA, where T98G Human Glioblastoma cell cultures were prepared, which were used to assess the protein concentration by the method described above, and showed that the cell line employed is a good pharmacological model due to high protein found.

Cannabinoids are a group of compounds present in Cannabis Sativa L plant. They mediate their physiological and behavioral effects by activating specific cannabinoid

receptors, and therefore the analytical technique of Western blot was performed to assess the presence of the receptor cannabinoid CB₁ on T98G Human Glioblastoma cell line and demonstrated that anandamide and WIN 55,212-2 mesylate exhibit some selectivity for this receptor plays a critical role in inducing of cell death.

For the cell viability assay cell suspension on T98G Human Glioblastoma cell line, which were seeded on 96-well plates at different concentrations with medium without FBS. Concentrations applied to cells of the compounds studied were: anandamide (0.5, 3 and 10 μ M), WIN 55,212-2 mesylate (2.5, 5 and 10 μ M) and temozolomide (25, 50 and 100 μ M); in incubation periods of 12, 24 and 48 hours in order to demonstrate the cytotoxic effect. According to the results of the percentage viability analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey test, in order to find significant difference with the control group.

It could identify cytotoxicity and potential synergistic antitumor action of temozolomide with cannabinoids and endogenous cannabinoids. Showed how these molecules work together to inhibit tumor growth in glial cells. Anandamide and WIN55,212-2 mesylate at a concentration of 10 μ M with 25 μ M temozolomide results in a reduction in cell viability (cellular damage) when cannabinoid receptors are activated in Glioblastoma, effectively inhibiting cell viability generating synergism on T98G Human Glioblastoma cell line.

These results demonstrate a new way to treat neurodegenerative diseases in the management of malignant gliomas as Glioblastoma Multiforme (GBM).

Key words: cannabinoids, anandamide, WIN55,212-2 mesylate, temozolomide, cannabinoid receptor, tumor, cancer, apoptosis.

ABREVIATURAS

GBM	: Glioblastoma multiforme
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
AEA	: Araquidonil etanolamida o Anandamida
CB ₁	: Receptor Cannabinoide 1
CB	: Cannabinoide
eCB	: Sistema endocannabinoide
TMZ	: Temozolamida
Δ^9 -THC	: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
CB ₂	: Receptor Cannabinoide 2
TRPV ₁	: Transient Receptor Potencial Catión Channel
GPR55	: G-protein coupled receptor 55
SCBe	: Sistema Cannabinoide Endógeno
SNC	: Sistema Nervioso Central
SNP	: Sistema Nervioso Periférico
GTP	: Guanosín trifosfato
2-AG	: 2-araquidonil-glicerol
AMPC	: Adenosín monofosfato cíclico
CB ₃	: Receptor cannabinoide 3
CBD	: Receptor abnormal
CGRP	: Gen de la Calcitonina
NKA	: Neurokinina A
ATP	: Adenosine triphosphate
NADA	: N-Araquidonoil-dopamina
PEA	: Palmitoil etanolamida
NAPE	: N-acil-fosfatidiletanolamina
NAT	: Enzima N-aciltransferasa
PKA	: Proteína kinasa A
NMDA	: N-metil-D-Aspartato
AA	: Ácido araquidónico
FAAH	: Fatty acid amide hydrolase
PGs	: Prostaglandinas

HETE	: Hidroxi-epoxi-eicosa-tri-enoicos
PGE ₂	: Prostamida E ₂
Δ ⁸ -THC	: Δ ⁸ -Tetrahidrocannabinol
DALN	: Desacetil-L-nantradol o desacetilevonantradol
ACEA	: Araquidonil-2-cloroetilamida
ACPA	: Araquidonilciclopropilamida
PEA	: Palmitoil etanolamida
12-HPETE	: 12-hidroxi-peroxi-eicosa-tetra-enoicos
GABA	: Ácido-γ-amino butírico
Glu	: Glutamato
FDA	: Food and Drug Administration
VIH	: Virus de inmunodeficiencia humana
SIDA	: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
RE	: Retículo endoplasmático
mTORC1	: Mammalian target of rapamycin complex 1
OMS	: Organización Mundial de la Salud
RNA	: Ácido ribonucleico
TP53	: Gen que codifica la proteína p53
CDKN2	: Gen que codifica la proteína p16
CDK4/6	: Kinasa dependiente de ciclinas 4/6
LOH	: Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10
PTEN	: Gen que codifica el homólogo de tensina y fosfatasa
EGFR	: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
MDM2	: Murine double minute 2
MRI	: Magnetic resonance imaging
MTIC	: Monometil triazenoimidazol carboxamida
AIC	: 5-amino-imidazol-4-carboxamida
BME	: Medio Basal de Eagle
MEM	: Medio Mínimo Esencial de Eagle
GMEM	: Medio MEM de Glasgow
IMDM	: Medio DMEM Modificado por Iscove
L-15	: Medio L-15 de Leibovitz

F-10	: Medio F-10 de Ham
F-12	: Medio F-12 de Ham
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
GFAP	: Proteína fibrilar ácida de la glía
MAO	: Monoamino oxidasa
ATCC	: American Type Culture Collection
PBS	: Buffer fosfato salino
DMSO	: Dimetil sulfóxido
MTS	: ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)
SDS	: Docecilsulfato
TBST	: Tris-Buffer Saline Tween 10X
TBE	: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
PEG	: Polietilenglicol
BCA	: Ácido Bicinconínico
RIPA	: Ensayo Radio Inmuno Precipitación
BSA	: Estándar de albúmina sérica bovina
WR	: Reactivo de trabajo
PAGE	: Polyacryl amide gel electrophoresis
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina
HRP	: Horse radish peroxidase
ANOVA	: Análisis de la varianza
MDR	: Multidrug resistance



DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera con la fuerza que me dio para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me presentaban.

A mis padres Javier H. Rosas Zevallos y Delia Alarcón Paliza por su amor, trabajo, apoyo moral, económico y sacrificio en todos estos años.

Por último a esos verdaderos amigos que han influenciado en mi vida, dándome los mejores consejos y apoyándome con espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mi objetivo propuesto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
 I. MARCO TEÓRICO.....	 5
1. EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO	6
1.1.Neurobiología del Sistema Cannabinoide Endógeno	8
1.1.1. Receptores cannabinoides.....	9
1.1.2. Receptores vanilloides	14
1.1.3. Cannabinoides endógenos.....	15
1.1.4. Síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación de Anandamida	18
2. TERMINOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES	21
2.1.Agonistas cannabinoides	21
2.1.1. Clásicos	24
2.1.2. No clásicos	24
2.1.3. Aminoalquilindoles.....	26
2.1.4. Eicosanoides	27
2.2.Agonistas vanilloides.....	27
2.3.Antagonistas cannabinoides/ Agonistas inversos	29
2.4.Antagonistas vanilloides.....	32
3. EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES	33
3.1.Efectos fisiológicos y farmacológicos	33
3.1.1. Efectos psicoactivos.....	34
3.1.2. Efectos sobre la sensación dolorosa.....	35
3.1.3. Actividad locomotora	36
3.1.4. Emesis.....	37
3.1.5. Proliferación celular.....	37
3.1.6. Efectos Neuroprotectores.....	37
3.1.7. Efectos sobre el metabolismo energético y la ingesta de alimento... ..	38
4. APOPTOSIS INDUCIDA POR CANNABINOIDES	39
5. GLIOBLASTOMA MULTIFORME	42
5.1.Tratamiento.....	45
5.1.1. Cirugía	45
5.1.2. Radioterapia	46
5.1.3. Quimioterapia	47
5.1.3.1.Temozolamida.....	47
6. CULTIVOS CELULARES	50
6.1.Medio de Cultivo	51

7. GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G	52
7.1. Modelo Farmacológico	53
II. MATERIALES Y MÉTODOS	54
1. MATERIALES	55
1.1.MATERIAL BIOLÓGICO.....	55
1.2.MATERIALES DE LABORATORIO	56
1.3.LUGAR DE INVESTIGACIÓN	59
2. METODOLOGÍA.....	60
2.1.CULTIVO DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G	60
2.2.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G	63
2.3.EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB ₁ EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G MEDIANTE WESTERN BLOT	67
2.4.PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CANNABINOIDES	79
2.5.PREPARACIÓN DE LA DROGA UTILIZADA	82
2.6.ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS	85
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
1. CULTIVO CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G	102
2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G	103
3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB ₁ EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G MEDIANTE WESTERN BLOT	107
4. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS	111
CONCLUSIONES	137
SUGERENCIAS	139
REFERENCIAS	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Cannabis Sativa L.....	6
Figura I.2. Estructura química del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	7
Figura I.3. Estructura de algunos de los endocannabinoides más representativos.....	9
Figura I.4. Núcleos con mayor densidad de receptores CB ₁ , en cerebro	11
Figura I.5. Representación tridimensional de la estructura del receptor cannabinoide CB ₁ (izquierda) y del receptor cannabinoide CB ₂ (derecha).....	12
Figura I.6. Mecanismo molecular de la ruta adenil ciclasa.....	13
Figura I.7. Vía de señalización de los receptores vanilloides	14
Figura I.8. Estructura química del Araquidonil etanolamida	16
Figura I.9. Estructura química del N-Araquidonoil-dopamina	16
Figura I.10. Estructura química del Palmitoil etanolamida.....	16
Figura I.11. Mecanismo propuesto para la formación de AEA	18
Figura I.12. Principales rutas metabólicas de AEA	21
Figura I.13. Estructura química del Δ^8 -Tetrahydrocannabinol	22
Figura I.14. Estructura química del Cannabinol	22
Figura I.15. Estructura química del (-)- Cannabidiol	23
Figura I.16. Estructura química del (-)-11-hidroxi- Δ^8 - tetrahydrocannabinol-dimetilheptil	23
Figura I.17. Estructura química de HU-210.....	23
Figura I.18. Estructura química de HU-211	23
Figura I.19. Estructura química de HU-243.....	24
Figura I.20. Estructura química de la Nabilona	24
Figura I.21. Estructura química del CP-55,940.....	25
Figura I.22. Estructura química del CP-55,244.....	25
Figura I.23. Estructura química del CP-50,556.....	25
Figura I.24. Estructura química del DALN.....	25
Figura I.25. Estructura química de Pravadolina.....	26
Figura I.26. Estructura química del R-(+)-WIN55,212-2	26
Figura I.27. Estructura química de ACEA	27
Figura I.28. Estructura química de ACPA	27
Figura I.29. Estructura química del 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida	28
Figura I.30. Estructura química del 12-hidroxi-peroxi-eicosa-tetra-enoicos (12-HPETE)	28
Figura I.31. Estructura química del SR141716A	29
Figura I.32. Estructura química del AM-251	30
Figura I.33. Estructura química del AM-281	30
Figura I.34. Estructura química del AM-630	30
Figura I.35. Estructura química del SR147778.....	31
Figura I.36. Estructura química del LY320135	31
Figura I.37. Estructura química del SR144528.....	32
Figura I.38. Estructura química del O-1184.....	32
Figura I.39. Estructura química del n-2-(4-clorofenil)etilico-1,3,4,5- tetrahydro-7,8-dihidroxi-2h-2-benzazepine- 2-carbothioamide.....	33
Figura I.40. Estructura química del agonista CP55,940.....	33
Figura I.41. Mecanismo de acción antitumoral de los cannabinoides	41
Figura I.42. Astrocito	42

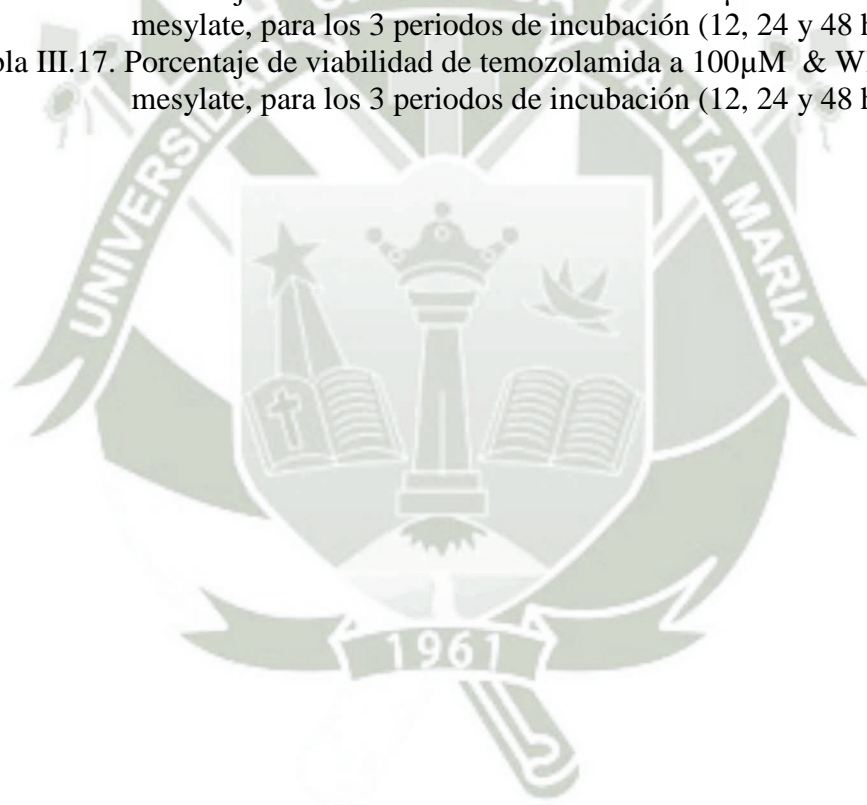
Figura I.43. Imagen de resonancia magnética de un Glioblastoma Primario	43
Figura I.44. Alteraciones y modo de evolución de los Glioblastomas primarios y secundarios	45
Figura I.45. Estructura química del 4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0]nona-2,7,9-triene-9-carboxamide	47
Figura I.46. Conversión del metabolito activo MTIC.....	48
Figura I.47. Hidrólisis del MTIC a AIC y metilhidrazina.....	49
Figura I.48. Esquema general del mecanismo de acción de la Temozolamida.....	50
Figura I.49. Glioblastoma Multiforme Humano T98G.....	53
Figura II.1. Cámara de nitrógeno líquido.....	55
Figura II.2. Material descartable utilizado	56
Figura II.3. Cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2)	57
Figura II.4. Espectrofotómetro con lector de platos de 96 celdas (Synergy™ HT, Biotek®	58
Figura II.5. Laboratorios de post-grado de School of Pharmaceutical Sciences de Massachusetts College and Health Science University (MCPHS University), Boston, USA.....	59
Figura II.6. Esquema general de la metodología empleada en la investigación	60
Figura II.7. Frasco de incubación de la primera generación	61
Figura II.8. Celulómetro o contador de células (Nexcelom BioScience®, AutoT4)	62
Figura II.9. Reacción del ensayo BCA	63
Figura II.10. Curva estándar de BSA por el método del ácido Bicinconínico (BCA)	70
Figura II.11. Representación gráfica de la muestra 3.....	71
Figura II.12. Preparación de un gel de poliacrilamida	74
Figura II.13. Equipo Trans-Blot SD, SEMI-DRY TRANSFER CELL.....	75
Figura II.14. Filtros y membranas de nitrocelulosa (a tamaño de 2.5cm * 3.5cm) remojadas en Transfer buffer en un recipiente de plástico	76
Figura II.15. Equipo Rocking Platform (Rotador de Temperatura Ambiente)	77
Figura II.16. Preparación de las drogas utilizadas	84
Figura II.17. Reacción del ensayo MTS.....	85
Figura II.18. Esquema del plato transparente de 96 pozos	88
Figura II.19. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra, para el PRE-Tratamiento de anandamida con temozolamida.....	91
Figura II.20. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra para el PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate con temozolamida	93
Figura II.21. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos para el POST-Tratamiento de temozolamida con anandamida	96
Figura II.22. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos para el POST-Tratamiento de temozolamida con WIN55,212-2 mesylate... ..	99
Figura III.1. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio invertido a 12 horas de incubación a 40X	102
Figura III.2. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio invertido a 24 horas de incubación a 40X	103
Figura III.3. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio	

invertido después de tres días de incubación a 40X.....	103
Figura III.4. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra 1 y 2, después que se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 562nm.....	104
Figura III.5. Valores de absorbancia de los estándares y de la muestra 1 y 2 en el espectrofotómetro a 562nm.....	105
Figura III.6. Curva estándar de BSA por el método del ácido Bicinónico (BCA)	106
Figura III.7. Estructura química del 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	108
Figura III.8. Anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano	109
Figura III.9. Análisis de Western Blot, expresión del receptor de cannabinoides CB ₁ en células de Glioblastoma multiforme humano T98G	110
Figura III.10. Efecto de anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.....	112
Figura III.11. Efecto de WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	114
Figura III.12. Efecto de temozolamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.....	116
Figura III.13. Efecto de anandamida & temozolamida a 25µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	118
Figura III.14. Efecto de anandamida & temozolamida a 50µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	119
Figura III.15. Efecto de anandamida & temozolamida a 100µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	120
Figura III.16. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 25µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	122
Figura III.17. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 50µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	123
Figura III.18. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 100µM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	124
Figura III.19. Efecto de temozolamida a 25µM & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	126
Figura III.20. Efecto de temozolamida a 50µM & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	128
Figura III.21. Efecto de temozolamida a 100µM & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.....	129
Figura III.22. Efecto de temozolamida a 25µM & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	131
Figura III.23. Efecto de temozolamida a 50µM & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	132
Figura III.24. Efecto de temozolamida a 100µM & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.....	133
Figura III.25. Efecto citotóxico sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Resumen cronológico de los principales hitos en la investigación en cannabinoide.....	7
Tabla I.2. Principales características de los receptores CB ₁ y CB ₂	10
Tabla I.3. Algunos Medios de Cultivo	51
Tabla II.1. Preparación de estándares diluidos de Albumina (BSA)	65
Tabla II.2. Preparación del gel separador o inferior.....	72
Tabla II.3. Preparación del gel superior o compactador	73
Tabla II.4. Preparación del Running buffer	73
Tabla II.5. Cantidad y ubicación de la muestra ³ en los hoyos.....	74
Tabla II.6. Preparación del Transfer buffer.....	75
Tabla II.7. Preparación del Washing buffer (TBST)	76
Tabla II.8. Preparación del Blocking buffer.....	77
Tabla II.9. Soluciones de anandamida	81
Tabla II.10. Soluciones de WIN55,212-2 mesylate	82
Tabla II.11. Soluciones de temozolamida.....	84
Tabla II.12. Esquema de cantidades usadas para los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	87
Tabla II.13. Esquema de cantidades usadas para el PRE-Tratamiento de anandamida con temozolamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	90
Tabla II.14. Esquema de cantidades usadas para el PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate con temozolamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	93
Tabla II.15. Esquema de cantidades usadas para el POST-Tratamiento de temozolamida con anandamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	99
Tabla II.16. Esquema de cantidades usadas para el POST-Tratamiento de temozolamida con WIN55,212-2 mesylate de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	102
Tabla III.1. Valores de absorbancias de los estándares.....	105
Tabla III.2. Valores que fueron usadas para elaborar la curva estándar de BSA.....	106
Tabla III.3. Porcentaje de viabilidad de anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	112
Tabla III.4. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	113
Tabla III.5. Porcentaje de viabilidad de temozolamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	115
Tabla III.6. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 25µM, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	117
Tabla III.7. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 50µM, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	118

Tabla III.8. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 100 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	119
Tabla III.9. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 25 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	121
Tabla III.10. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 50 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	122
Tabla III.11. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 100 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	124
Tabla III.12. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 25 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	126
Tabla III.13. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 50 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	127
Tabla III.14. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 100 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	128
Tabla III.15. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 25 μ M & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	130
Tabla III.16. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 50 μ M & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas)	131
Tabla III.17. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 100 μ M & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).....	132



INTRODUCCIÓN

Los cannabinoides son un grupo de compuestos que se encuentran en la planta de marihuana (*Cannabis sativa* L.). La marihuana ha sido utilizada tanto para fines recreativos y medicinales desde hace varios siglos. Estos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las náuseas y vómitos asociados con la quimioterapia del cáncer [10].

Los cannabinoides es uno de los impulsos de la investigación científica más activa de estos tiempos, que ha permitido identificar los receptores que son activados o inhibidos por estas sustancias, células dianas que forman parte de un nuevo "sistema cannabinoide", y que, como muchos otros sistemas es susceptible de manipulación farmacológica [6]. Este sistema permite su aplicación en el tratamiento de diferentes enfermedades neurológicas como el Glioblastoma multiforme (GBM), por ello mediante la activación de estos receptores se frena el crecimiento de gliomas ocasionado por la citotoxicidad que ejercen [7].

El Glioblastoma multiforme es la forma más común y agresiva de tumor cerebral primario maligno, con una tasa de supervivencia de menos de dos años [1,2]. Actualmente, se cree que el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas combinadas puede ofrecer un mejor pronóstico para los pacientes que sufren este tipo de cáncer. Generalmente el éxito del posible tratamiento se ve obstaculizado por diversos factores tales como el rápido crecimiento, el alto grado de infiltración y la extrema resistencia a la quimioterapia exhibida por estos tumores. Por tanto es posible que terapias combinadas puedan proporcionar mejores resultados que las que usan solo

un fármaco [3]. El tratamiento para este tipo de cáncer generalmente implica una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. La temozolomida es especialmente útil en la quimioterapia [4,5].

Este estudio se realizó para identificar el potencial de acción antitumoral sinérgica y citotóxica de la temozolomida; un fármaco que ataca al DNA y que constituye el patrón de referencia actual en el manejo de los gliomas malignos [9], con endocannabinoides y cannabinoides para mostrar cómo estas moléculas trabajan juntas para inhibir el crecimiento tumoral en las células gliales induciendo la apoptosis.

Los cannabinoides usados en esta investigación fueron la Anandamida un cannabinoide endógeno natural y WIN55,212-2 mesylate que es un agonista cannabinoide sintético potente [8]. Estos ejercen efectos antiproliferativos en cultivos celulares de una amplia gama de líneas tumorales, como la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G que es un modelo in vitro utilizado en la actualidad para la investigación en neurociencia [11]; que fue potencialmente útil en este estudio para la evaluación del efecto citotóxico.

HIPÓTESIS

Dado que existe evidencia de acción antineoplásica de cannabinoides y endocannabinoides, en diferentes tipos de cáncer, es posible que el cannabinoide endógeno natural (anandamida) y el agonista cannabinoide sintético no selectivo (WIN55,212-2 mesylate) en asociación con la temozolamida, limiten el crecimiento del tumor disminuyendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis de las células de glioma.

OBJETIVOS

1. Demostrar in vitro el efecto citotóxico de los cannabinoides, endocannabinoides y la temozolamida; solos y en combinación, sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G.
2. Demostrar un probable sinergismo de los cannabinoides, endocannabinoides con la Temozolamida sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el tratamiento de Glioblastoma Multiforme.
3. Evidenciar la presencia del receptor CB₁ en células de glía (astrocitos) mediante el ensayo de Western Blot, con la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G.
4. Comprobar la selectividad de los cannabinoides y endocannabinoides con el receptor CB₁ sobre las células patológicas mediante la viabilidad celular.
5. Demostrar en la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G que la anandamida y el WIN55,212-2 mesylate son ligandos del receptor CB₁ induciendo muerte celular (apoptosis).



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. EL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en una resina secretada a partir de las hojas y brotes florecidos de la planta de marihuana (*Cannabis Sativa Linnaeus.*) (Figura I.1). El uso de esta planta tiene una gran antigüedad, particularmente en la India, se consumía en las ceremonias religiosas tribales y también se tomaba como medicina. En el siglo XIX, se prescribía ampliamente en el mundo occidental para varias dolencias y malestares, como la tos, fatiga, reumatismo, asma, jaquecas y reglas dolorosas. Permaneció en la farmacopea de los Estados Unidos hasta el año 1937, en el que tras la aparición de la Ley de Impuestos “Marijuana Tax Act” y la introducción de los analgésicos e hipnóticos sintéticos, se completó su derogación como medicina [10].



Figura I.1. Cannabis Sativa L.

Fuente: <http://www.hablandodeciencia.com>

La planta Cannabis Sativa L. contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes, de los que unos 60 son considerados dentro del grupo de los cannabinoides. El punto de partida de la investigación en el campo de los cannabinoides puede situarse en el año 1964, cuando los investigadores Gaoni y Mechoulam realizaron el aislamiento y síntesis química del principio activo de la Cannabis Sativa, el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Figura I.2), quien posee propiedades psicotrópicas y medicinales [12]. Dicho hallazgo supuso el origen

para años de investigación fructífera, los cuales se encuentran resumidos en las referencias que se muestran en la Tabla I.1.

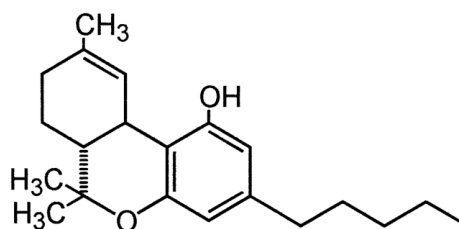


Figura I.2. Estructura química del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol.
Fuente: Elaboración propia.

Tabla I.1. Resumen cronológico de los principales hitos en la investigación en cannabinoides.

Evento	Fecha	Referencia
Primeros usos médicos del Cannabis Sativa L.	3000 A.C	[10]
Aislamiento del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	1964	[12]
Cannabinoides sintéticos	1980-1988	[13]
Receptores cannabinoides	1988	[8]
Neurofarmacología CB₁	1988-1995	[8]
Aislamiento y bioquímica de la Anandamida	1992-1995	[8]
Neurofarmacología de la Anandamida	1993-1997	[8]
Aislamiento y funciones del 2-araquidónil glicerol	1995-1997	[6]
Identificación del resto de receptores cannabinoides(CB2, TRPV1, GPR55) y las enzimas de síntesis de los endocannabinoides	Década de los noventa en adelante	[6]

Fuente: Elaboración propia.

Durante estos años, los resultados de las investigaciones no solo se han centrado en la explicación de las bases farmacológicas de los efectos de los cannabinoides, sino que los investigadores fueron capaces de demostrar que los cannabinoides (CB) presentes en la planta producían sus efectos psicotrópicos activando una serie de receptores presentes en las membranas de las células nerviosas, sobre todo en las neuronas, los llamados receptores CB, receptores que, de forma fisiológica, eran activados por una serie de sustancias señalizadoras de naturaleza lipídica, los llamados endocannabinoides (eCB), y

que ambos elementos, junto con las enzimas responsables de la síntesis y degradación de estos eCB, formaban parte de un nuevo sistema de comunicación cerebral que se denominó "Sistema Cannabinoide Endógeno" (sCBe) [13]. Esto ha supuesto un claro avance para el estudio de las importantes implicaciones de los cannabinoides en la funcionalidad del Sistema Nervioso Central (SNC) así como en la expresión de la conducta.

1.1. Neurobiología del Sistema Cannabinoide Endógeno

En la actualidad se conoce que el sCBe, constituye un nuevo sistema de comunicación intercelular, con funciones principalmente de tipo modulador, que en el SNC servirían para facilitar los procesos sinápticos de señalización retrógrada; por tanto, tendría un papel crítico en el control de un exceso de transmisión excitatoria o inhibitoria [14]. Actuaría, por tanto, como un sistema de protección a nivel sináptico y por extensión, como un regulador de la homeostasis neuronal y celular en general.

El comportamiento del sCBe al igual que otros sistemas de neurotransmisión del organismo, esta compuesto principalmente por receptores específicos de membrana como el receptor cannabinoide CB₁, densamente expresado en el SNC; y el receptor cannabinoide CB₂, localizado en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y relacionado con el Sistema Inmune. Además el sCBe cuenta con unos ligandos endógenos que activan estos receptores, siendo los más conocidos la anandamida y el 2-araquidonilglicerol [12]. La evidencia de la existencia de un sCBe en el organismo ha proporcionado nuevas perspectivas de investigación en el campo de los cannabinoides cuyos objetivos se basan en dilucidar el papel fisiológico de este sistema así como su mediación en los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides exógenos sobre el organismo.

1.1.1. Receptores cannabinoides

Los cannabinoides producen sus efectos sobre el organismo mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta ahora, se han descrito (clonado y aislado) al menos dos tipos de receptores, cuyas principales características se resumen en la Tabla I.2. Estos receptores aparecen siempre acoplados a proteínas que unen GTP, por tanto, se trata de receptores metabotrópicos, que se han llamado receptor CB₁, que fue el primero en ser descrito y es el responsable de la psicoactividad de algunos componentes de la Cannabis Sativa [15], y receptor CB₂, que fue el segundo tipo de receptor CB descrito y al que inicialmente se relacionó casi exclusivamente con las células del Sistema Inmune, aunque posteriormente se le ha identificado también en algunos otros tejidos, incluyendo el propio SNC [16].

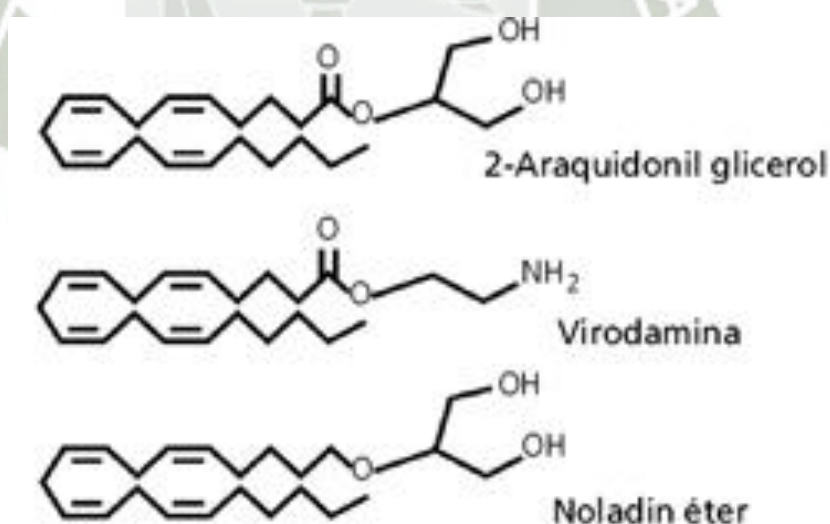


Figura I.3. Estructura de algunos de los endocannabinoides más representativos.

Fuente: <http://www.sebbm.com>

Tabla I.2. Principales características de los receptores CB₁ y CB₂.

	Receptores CB₁	Receptores CB₂
Localización	<ul style="list-style-type: none"> • SNC • Terminales nerviosos periféricos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Células del Sistema Inmune.
Ligandos endógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Araquidoniletanolamida o Anandamida (AEA). • 2-araquidonil-glicerol. • 2-Araquidonil gliceril éter noladin (Noladin-éter). 	<ul style="list-style-type: none"> • 2-araquidonil-glicerol (2-AG) • Viroadamina
Otros agonistas	<ul style="list-style-type: none"> • SELECTIVOS: <ul style="list-style-type: none"> - ACEA y ACPA (eicosanoides) • NO SELECTIVOS: <ul style="list-style-type: none"> - Δ⁹-Tetrahidrocannabinol - CBN - CP-55,940 - Desacetil-levonantradol (cannabinoide clásico) - WIN-55,212 (cannabinoide sintético) 	<ul style="list-style-type: none"> • SELECTIVOS: <ul style="list-style-type: none"> - HU-308 - JWH-133 - HU-910
Antagonistas	<ul style="list-style-type: none"> • SR141716 o Rimonabant • AM251 • LY320135 • Taranabant • Surinabant 	<ul style="list-style-type: none"> • SR144528 • AM630

Fuente: Elaboración propia.

El **receptor CB₁** es un polipéptido de 476 aminoácidos que fue caracterizado farmacológicamente utilizando el cannabinoide sintético (-)-CP-55.940. Este receptor media, entre otros, los efectos psicoactivos de los cannabinoides. En humanos, su gen se encuentra localizado en la región q14-q15 del cromosoma 6 [17].

Localización: Es un miembro de la super familia de receptores acoplados a proteínas G_{i/o} que se inserta en la membrana plasmática, donde se une tanto al Δ⁹-THC como a los endocannabinoides, caracterizados por poseer siete dominios transmembranales en su estructura. Ha sido localizado en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo a muy altas concentraciones (Figura I.4), siendo el receptor más abundante de los acoplados a proteínas G en el cerebro de

los mamíferos. En menor concentración, se encuentra en hipotálamo y médula espinal. También se expresa en sistema nervioso periférico (SNP), testículos, sistema inmune, glándula adrenal, médula ósea, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, próstata, timo, amígdalas y bazo [15].

Desde el punto de vista celular, el receptor CB_1 se localiza preferentemente en neuronas, aunque también se ha encontrado en células de glía (astrocitos y oligodendrocitos), siendo las neuronas de tipo gabérgico (inhibitorias) o glutamatérgico (excitatorias) donde se localizan de forma mas habitual, aunque también aparecen en neuronas peptidérgicas (opioides), serotoninérgicas o colinérgicas [17].

El receptor CB_1 se expresa principalmente como receptor presináptico y su efecto fundamental es modificar la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato y serotonina.

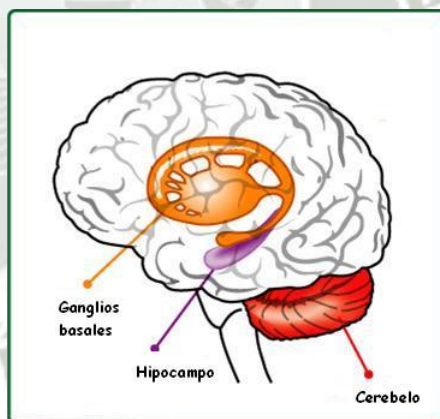


Figura I.4. Núcleos con mayor densidad de receptores CB_1 , en cerebro.

Fuente: <http://www.geocities.ws/marihuanalibertad/receptores.html>

El **receptor CB_2** es un polipéptido de 360 aminoácidos que también pertenece al grupo de receptores unidos a proteínas $G_{i/o}$, presenta un 44% de homología global con el receptor CB_1 .

Localización: Ha sido localizado en órganos linfoides como: bazo, timo, amígdalas, medula ósea y páncreas, en células mieloides, macrófagos y monocitos de bazo, en leucocitos de sangre circulante y en una gran variedad de líneas de células inmunes en cultivo (células mieloides y eritroides, macrófagos, mastocitos y linfocitos T y B) [18]. También en el cerebro, donde se expresa de forma muy restringida en algunas pocas sub poblaciones neuronales, preferentemente en el tallo cerebral y en el cerebelo; también en células de glía, sobre todo en células de microglía cuando estas cambian su fenotipo durante procesos de activación causados por daño cerebral de origen inflamatorio, infeccioso, traumático o tóxico[16]. Además ha sido detectado por secuenciado molecular en células endoteliales aisladas de arterias pulmonares de carnero. Al contrario que el receptor CB₁ su activación no modifica la liberación de neurotransmisores [18].

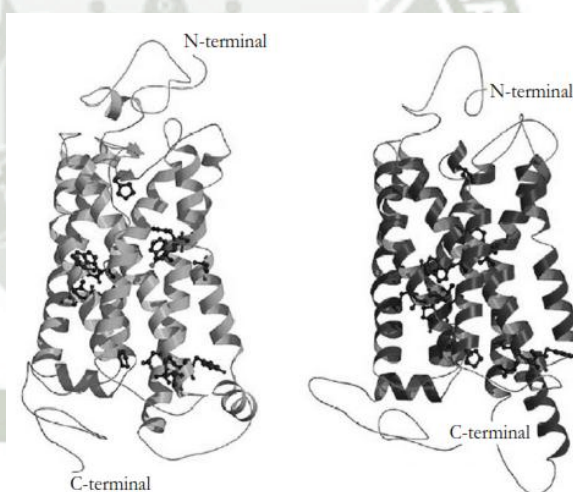


Figura I.5. Representación tridimensional de la estructura del receptor cannabinoide CB₁ (izquierda) y del receptor cannabinoide CB₂ (derecha)

Fuente: <http://www.elsevier.es>

Mecanismos moleculares: La investigación biológica ha demostrado una serie de vías celulares a través de las cuales pueden actuar los cannabinoides.

Los cannabinoides pueden elegir como blanco las células tumorales a través de los receptores CB que inducen la detención del crecimiento, la muerte celular y el bloqueo de migración [19]. Tanto el receptor CB₁ como el CB₂ son receptores acoplados a proteínas G (Gi/o), la inhibición de la proliferación de varios tipos de células tumorales posiblemente ocurre a través de rutas como adenil ciclasa, que actúa inhibiendo la enzima adenilato ciclasa y que conducen a la disminución de los niveles de AMPc y las actividades celulares dependientes de este, como apertura de canales de potasio, y bloqueo de canales de Ca⁺⁺ (Figura I.6). En algunos casos, se ha visto que los agonistas endógenos del receptor de cannabinoides estimulan la formación de AMPc posiblemente activando proteínas Gs [20].

Algunas de las posibilidades que se han sugerido incluirían un posible tipo de receptor CB, para algunos ya denominado **receptor CB₃**, que sería específico del sistema cardiovascular, también el **receptor abnormal CBD**, identificado inicialmente en el endotelio o los **receptores huérfanos GPR55 y GPR119**. El receptor GPR55 tiene, de hecho, una amplia distribución en el SNC, ya que se ha encontrado en los ganglios basales, en el hipocampo, en el tálamo y en el cerebelo; también se ha encontrado en órganos periféricos (hígado, bazo e intestino) [21,22].

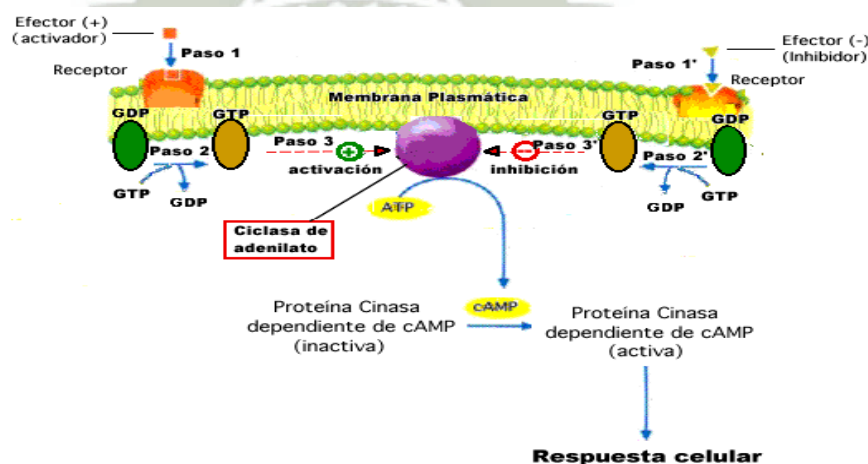


Figura I.6. Mecanismo molecular de la ruta adenil ciclasa

Fuente: <http://www.oocities.org/pelabzen/metabcarb.html>

1.1.2. Receptores vanilloides

Por otro lado, también habría que mencionar la relación cada vez más evidente del llamado receptor vanilloide TRPV₁ (por sus siglas en inglés: *Transient Receptor Potencial Cation Channel*). Los receptores TRPV₁ pertenecen a una familia de canales iónicos no selectivos para distintos tipos de cationes (Na⁺, Ca⁺⁺ y H⁺)[22,23]. El receptor de vanilloides VR₁ posee una estructura tridimensional donde se observan seis segmentos transmembrana completos y otro parcial, que es el que se supone está asociado a un canal de Ca⁺⁺ (Figura I.7). En el extremo N-terminal existen tres zonas sensibles a la fosforilación por protein-kinasa A [23].

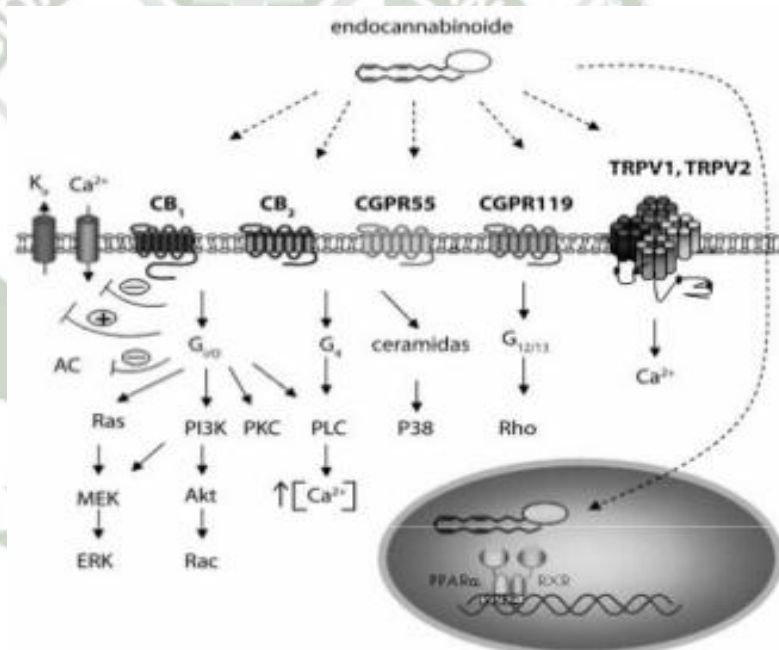


Figura I.7. Vía de señalización de los receptores vanilloides.

Fuente: http://leydedrogasenvenezuela.blogspot.com/2013_04_01_archive.html

Los receptores TRPV₁ podrían ser los receptores de tipo ionotrópico del sCBe, en contraste con los receptores CB₁, CB₂ y GPR55, que, debido a su acoplamiento a proteínas G, serían los receptores de tipo metabotrópico [22]. Hasta el momento solo un receptor vanilloide ha sido clonado (VR₁), aunque hay

evidencias farmacológicas y bioquímicas de la existencia de otros receptores de esta familia que se denominan VR_s.

Localización: El receptor VR₁ ha sido clonado y se encuentra principalmente en neuronas sensoriales, diversos núcleos cerebrales, tejidos no neuronales (como mastocitos), células gliales y en fibras aferentes primarias de pequeño diámetro. También se encuentra en el aparato cardiovascular, tanto en el corazón como en la adventicia de los vasos sanguíneos. Es estimulado por calor, protones, capsaicina y anandamida; y al activarse libera: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA) y adenosine triphosphate (ATP). Estas sustancias producen taquicardia y vasodilatación [19,23].

Mecanismo: VR₁ forma parte de una familia de receptores acoplados a canales iónicos y su activación puede desencadenar una serie de respuestas como la excitación de neuronas perivasculares sensoriales en la pared de los vasos que liberan CGRP y efectos cardiovasculares sobre el sistema inmunológico y modulación de la sensación dolorosa [23,24].

1.1.3. Cannabinoides endógenos

Los cannabinoides endógenos también denominados endocannabinoides, son derivados de ácidos grasos poliinsaturados, presentados por el ácido araquidónico. Estos compuestos presentan semejanza a otros transmisores lipídicos eicosanoides como las prostaglandinas o leucotrienos [26].

Los eCB hasta ahora caracterizados en su vía de síntesis, son derivados del ácido araquidónico conjugado con etanolamida o glicerol. Los más representativos son:

- Araquidonil etanolamida conocida como Anandamida (AEA) (Fig.I.8)
- 2-Araquidonoil glicerol (2-AG) (Fig.I.3)
- Virodamina (Fig.I.3)
- 2-Araquidonil gliceril éter noladin (noladin éter) (Fig.I.3)
- N-Araquidonoil-dopamina (NADA) (Fig.I.9)

- Palmitoil etanolamida (PEA) (Fig.I.10)

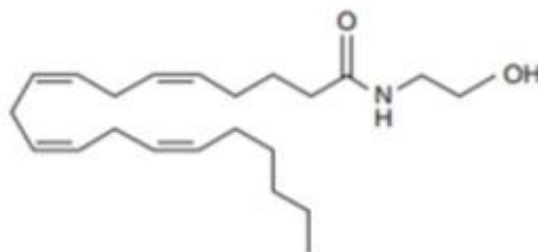


Figura I.8. Estructura química del Araquidonil etanolamida.

Fuente: Elaboración propia.

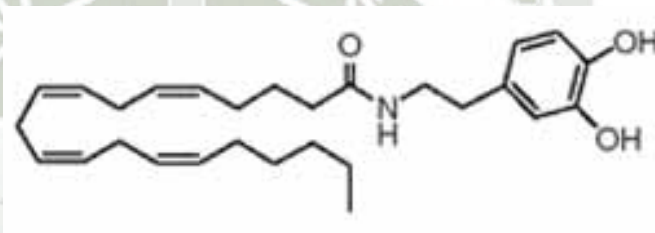


Figura I.9. Estructura química del N-Araquidonil-dopamina.

Fuente: Elaboración propia.

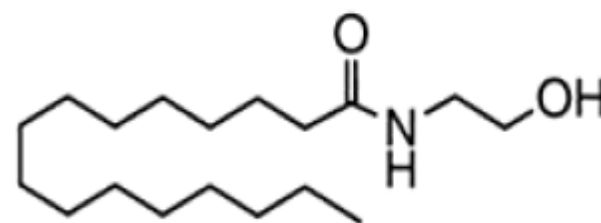


Figura I.10. Estructura química del Palmitoil etanolamida.

Fuente: Elaboración propia.

La primera sustancia endógena identificada como agonista del receptor CB fue el Araquidonil etanolamida, denominándose anandamida (AEA) que procede de la unión de las palabras "ananda" (pacer, en sarcástico) y "amida" (por su

estructura química). Este compuesto está formado por ácido araquidónico unido por un enlace amida a etanolamina. Fue aislado y caracterizado en 1992 [27], por primera vez en el cerebro del cerdo y en tejidos periféricos humanos y de rata. En ambas especies se ha detectado en hipocampo, estriado y cerebelo, regiones ricas en receptores CB, así como en tálamo, donde la expresión de este receptor es mucho más baja. Cantidades importantes de AEA también se han localizado en el bazo, donde hay altos niveles de receptores CB₂ [28].

Las concentraciones del eCB AEA en el cerebro es 200 veces mayor que el 2-AG. Teniendo en cuenta que el 2-AG es un intermediario metabólico de los lípidos mientras que la AEA es el producto de la hidrólisis de un fosfolípido de la membrana celular [28,30].

Su estructura no está relacionada a los cannabinoides naturales, sin embargo la anandamida es capaz de inducir la inhibición de la adenilato ciclasa al igual que el Δ^9 -THC; además su administración produce los efectos clásicos de la actividad cannabinoide, como son: la inmovilidad, la catalepsia, la analgesia y la hipotermia [28,29].

Otro eCB importante es el 2-Araquidonoil glicerol (2-AG), fue descubierto en 1995, está formado por ácido araquidónico unido por un enlace éster a glicerol. Inicialmente fue aislado en intestino de perro y posteriormente en bazo y páncreas, lo que hizo pensar que se trataba de un ligando periférico. Más tarde fue identificado en cerebro, donde se encuentra a las máximas concentraciones en tronco cerebral, estriado e hipocampo y las más bajas en corteza, diencéfalo y cerebelo [30].

El 2-AG tiene efecto hipotensor que no es mediado por receptores CB₁. Este efecto es atenuado por los inhibidores de la ciclo oxigenasa, indicando que puede ser mediado por ácido araquidónico u otros metabolitos. También está implicado en diversos procesos fisiopatológicos como activación de la agregación plaquetaria [28,30].

1.1.4. Síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación de Anandamida

Síntesis: La AEA es el producto de la hidrólisis del N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE). En la Figura I.11. Se esquematiza uno de los posibles mecanismos de la formación de la AEA. La AEA es sintetizada por la enzima N-aciltransferasa (NAT) al catalizar la transferencia de ácido araquidónico desde la fosfatidilcolina a la cabeza del grupo de fosfatidil etanolamida. Esta reacción puede ser iniciada por el aumento intracelular de Ca^{2+} y es regulada por AMPc, que aumenta la actividad de la NAT por fosforilación mediada por la proteína kinasa A (PKA) dependiente de AMPc [31,32].

La liberación de AEA desde NAPE es catalizada por una fosfolipasa D (por sus siglas en inglés PLD). La actividad de PLD es ampliamente regulada por la activación del receptor ionotrópico glutamato N-metil-D-Aspartato (NMDA), por receptores neuronales nicotínicos o por estimulación de un receptor metabotrópico de los principales neurotransmisores incluyendo la dopamina, el glutamato y la acetilcolina en neuronas corticales [31].

La síntesis de AEA se produce a demanda en el organismo, es decir, que al contrario de los neurotransmisores clásicos que se almacenan en vesículas, la AEA es sintetizada “en el momento” en el que se va a liberar.

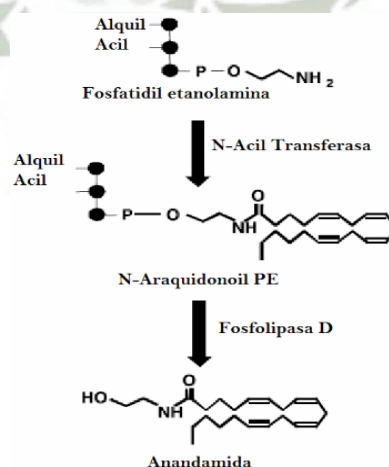


Figura I.11. Mecanismo propuesto para la formación de AEA.

Fuente: <http://www.sebbm.com>

Almacenamiento: Los eCB no se almacenan en el interior de vesículas como ocurre con los neurotransmisores clásicos, probablemente por su naturaleza hidrófoba. Su almacenamiento se produce en forma de un precursor (fosfolípido de membrana) que es hidrolizado posteriormente y se sintetiza cuando su acción es necesaria. Los eCB podrían ser otro tipo de intermediario metabólico lipídico, que, como los eicosanoides y el factor activador de plaquetas, se sintetizan por la hidrólisis de un fosfolípido, actuando cerca del sitio de producción, donde también se degradan rápidamente [33]. Su solubilidad en lípidos les permitiría difundir libremente a través de las membranas y actuar como moduladores de diversas actividades biológicas.

Liberación: La liberación de AEA es dependiente del calcio y se dispara por la despolarización neuronal (espacio intersináptico), por un mecanismo de difusión facilitada bidireccional, realizada a favor de un gradiente de concentración. De hecho, la formación de anandamida tiene una variabilidad regional específica: se ha encontrado su liberación en el estriado dorsal tras la activación del receptor de dopamina D2, pero no en el hipocampo tras la despolarización neuronal, donde si se dispara la producción de otros endocannabinoides [34].

Recaptación: La AEA es recaptada de forma selectiva tanto por neuronas como por células gliales, donde es degradada a etanolamina y el correspondiente ácido graso (ácido araquidónico). Existe una gran controversia sobre si este proceso de recaptación es mediado por un transportador específico o no [35]. Este mecanismo de recaptación es rápido, temperatura dependiente y con selectividad por el sustrato. Incluso se han sintetizado sustancias con posible efecto inhibitor de la recaptación en neuronas y astrocitos como un derivado fenólico, N(4-hidroxifenil) araquidonamida (AM404), que inhibiría la recaptación de anandamida, lo que hace pensar en la existencia de un transportador específico [36].

Metabolismo: La AEA es metabolizada muy rápidamente por lo que la duración de su efecto es muy corta. La utilización de inhibidores de su degradación puede prolongar la duración de su efecto farmacológico.

La anandamida se metaboliza por cuatro mecanismos principales (Figura I.12):

1. Hidrólisis producida por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH):

que transforma la AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamina (Fig.I.12) y además cataliza el proceso inverso transformando el AA más etanolamina en AEA. La FAAH ha sido purificada, clonada y secuenciada. Esta enzima actúa también sobre análogos de AEA como 2-AG, palmitoiletanolamida y oleamida y sobre la R(+)-metanandamida, aunque la afinidad de la enzima FAAH por R(+)-metanandamida es menor que la de AEA [37,38].

El AA resultante de esta reacción, puede ser metabolizado por la COX a PGs.

2. Citocromo P450 (CYP450):

La AEA puede ser oxidada en el hígado por el CYP450 3A transformándose en unos veinte metabolitos activos. Además el CYP450 es capaz de metabolizar el AA formado por la FAAH al hidrolizar la AEA, dando lugar a un gran número de compuestos como los ácidos hidroxi-epoxi-eicosa-tri-enoicos (HETE) [39].

3. Oxidación por Ciclooxygenasa 2 (COX₂):

Recientemente se ha demostrado que la AEA puede ser sustrato de la COX₂ que la transforma en prostaglandina E₂-etanolamida y D₂-etanolamida. Estos productos han sido denominados “**prostamidas**”. La prostamida E₂ tiene un perfil de acción parecido a la PGE₂, no se une al receptor CB₁ y se une al CB₂ con muy baja afinidad [40].

4. Lipooxygenasa (LOX):

La lipooxygenasa puede actuar directamente sobre la AEA produciendo 5/11/12/15-H(P)-anandamida, asimismo puede metabolizar el AA producto de la hidrólisis de AEA [41].

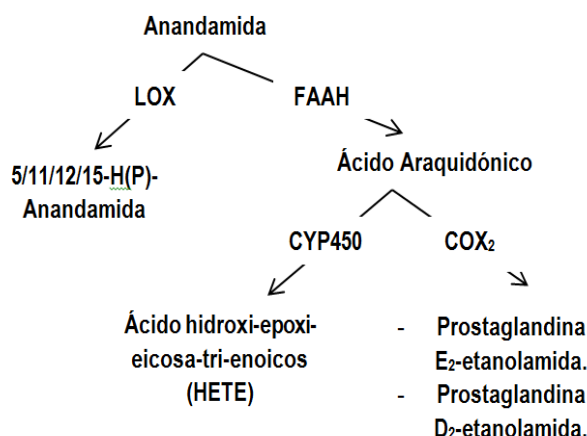


Figura I.12. Principales rutas metabólicas de AEA
Fuente: Elaboración propia.

2. TERMINOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES

2.1. Agonistas cannabinoides

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores CB, activando las respuestas mediadas por éstos. Los agonistas cannabinoides han sido clasificados en función de su estructura química en cuatro clases:

2.1.1. Clásicos

Son aquellos que presentan una estructura de dibenzopirano, entre ellos están los cannabinoides derivados de la *Cannabis Sativa* L., productos procedentes de su biotransformación, o derivados sintéticos de los mismos[42]; como:

- Δ^9 -THC (Fig.I.2)
- Δ^8 -Tetrahidrocannabinol (Δ^8 THC) (Fig.I.13)
- Cannabinol (Fig.I.14)
- (-)-Cannabidiol(Fig.I.15)
- (-)-11-hidroxi- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-dimetilheptil (Fig.I.16)
- HU-210(Fig.I.17)

- HU-211 (Fig.I.18)
- HU-243 (Fig.I.19)
- Nabilona (Fig.I.20)

El Δ^9 -THC es el principal componente psicoactivo del Cannabis Sativa L., cuya estructura química fue caracterizada en el año 1964. Este compuesto tiene una afinidad semejante por los dos receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ [43,44].

Los compuestos como el Δ^8 -THC, el cannabinal y el cannabidiol; son también componentes psicoactivos del Cannabis Sativa L., mientras que HU-210 y (+) HU-211(enantiómero de HU-210) son cannabinoides sintéticos [43].

La afinidad del Δ^8 -THC por los receptores CB es muy parecida a la del Δ^9 -THC, mientras que su análogo sintético HU-210 tiene una afinidad y una actividad intrínseca mucho más alta que el Δ^9 -THC [45].

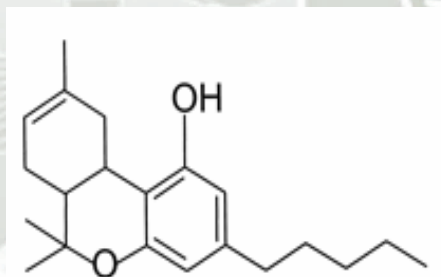


Figura I.13. Estructura química del Δ^8 -Tetrahydrocannabinol.
Fuente: Elaboración propia.

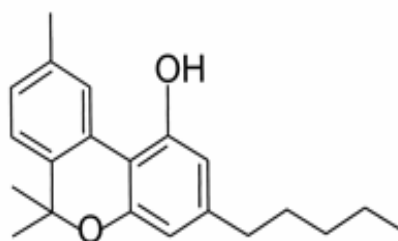


Figura I.14. Estructura química del Cannabinal.
Fuente: Elaboración propia.

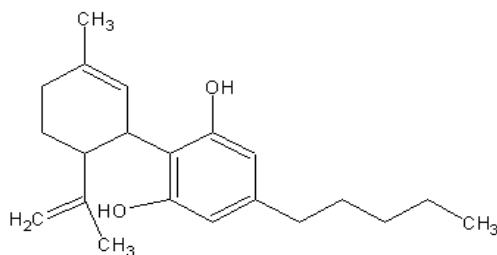


Figura I.15. Estructura química del (-)-Cannabidiol.

Fuente: Elaboración propia.

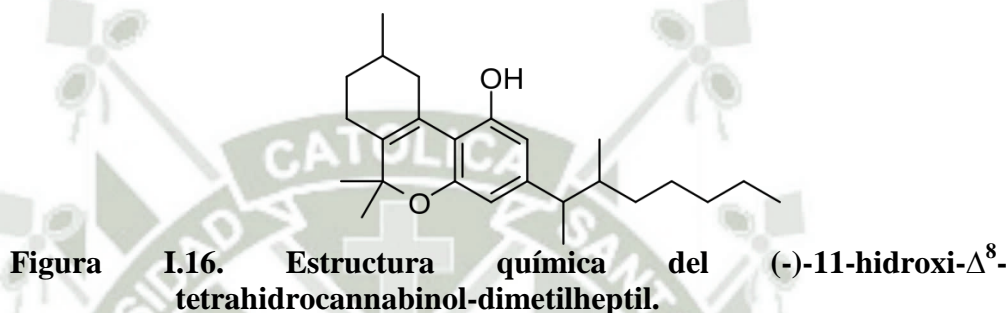


Figura I.16. Estructura química del (-)-11-hidroxi- Δ^8 -tetrahidrocannabinol-dimetilheptil.

Fuente: Elaboración propia.

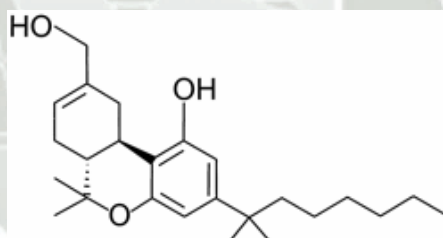


Figura I.17. Estructura química de HU-210.

Fuente: Elaboración propia.

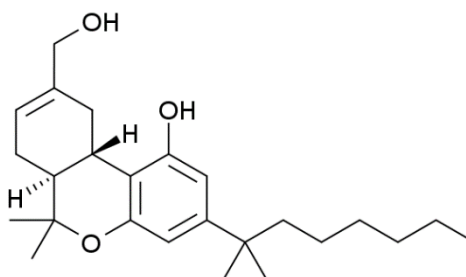


Figura I.18. Estructura química de HU-211.

Fuente: Elaboración propia.

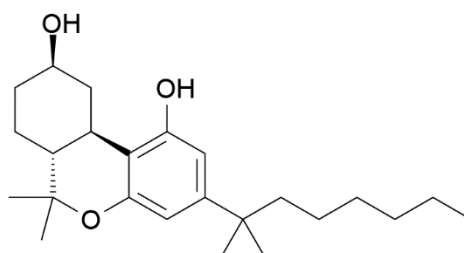


Figura I.19. Estructura química de HU-243.

Fuente: Elaboración propia.

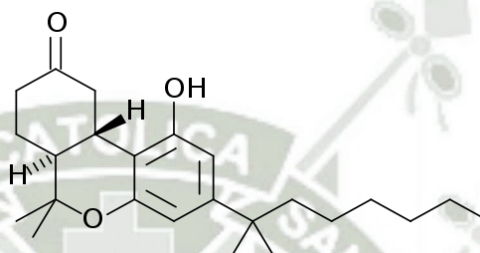


Figura I.20. Estructura química de la Nabilona.

Fuente: Elaboración propia.

2.1.2. No clásicos

Son similares en estructura a los cannabinoides clásicos, es decir, estos consisten en análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen del anillo pirano.

El representante principal de este grupo es el CP-55,940 (Fig.I.21), que permitió el descubrimiento y la caracterización del receptor de cannabinoides CB₁. El CP-55,940 es un compuesto con una afinidad similar por los dos subtipos de receptores CB, menos lipófilo y de 10 a 50 veces más potente in vivo que el Δ^9 -THC. Se utilizó para demostrar, por primera vez, la presencia de receptores específicos para cannabinoides en cerebro de rata [46].

Otros agonistas cannabinoides como:

- CP-55,244(Fig.I.22)
- CP-50,556 (L-nantradol o levonantradol)(Fig.I.23)
- DALN(desacetil-L-nantradol o desacetilevonantradol)(Fig.I.24)

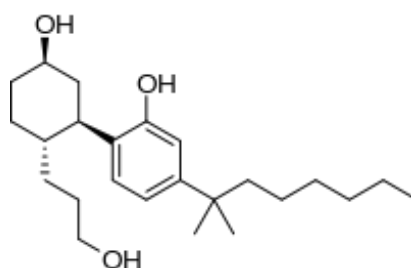


Figura I.21. Estructura química del CP-55,940.

Fuente: Elaboración propia.

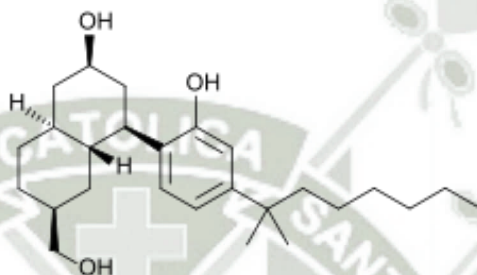


Figura I.22. Estructura química del CP-55,244.

Fuente: Elaboración propia.

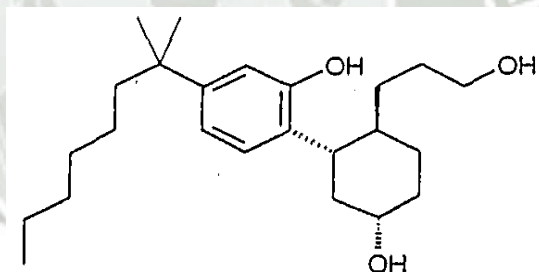


Figura I.23. Estructura química del CP-50,556.

Fuente: Elaboración propia.

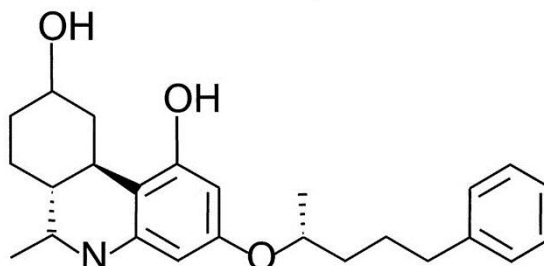


Figura I.24. Estructura química del DALN.

Fuente: Elaboración propia.

2.1.3. Aminoalquilindoles

Esta nueva familia fue descubierta por los investigadores de Sterling-Winthrop al desarrollar análogos estructurales de pravadolina (Fig.I.25) [47]. Los Aminoalquilindoles incluyen moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina.

De los pertenecientes a este grupo, su principal representante es el R-(+)-WIN55,212-2 (Fig.I.26), que presenta una alta afinidad y eficacia en su interacción con ambos tipos de receptores CB, aunque exhibe cierta selectividad por los receptores CB₁ [48]. Su actividad farmacológica en ensayos *in vivo* es similar a la del Δ^9 -THC, aunque existen evidencias de que el R-(+)-WIN55,212-2 interacciona con los receptores CB de manera distinta a como lo hacen los análogos clásicos y no clásicos [47].

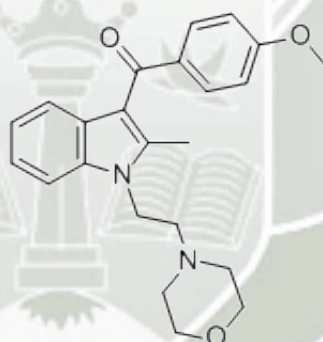


Figura I.25. Estructura química de Pravadolina.

Fuente: Elaboración propia.

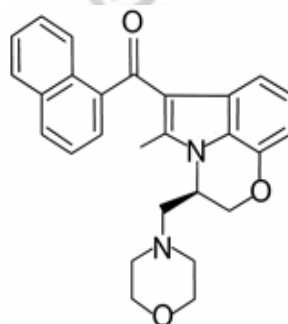


Figura I.26. Estructura química del R-(+)-WIN55,212-2.

Fuente: Elaboración propia.

2.1.4. Eicosanoides

Son el último grupo descrito de agonistas CB, y son derivados del AA, aquí se incluyen los ligandos endógenos, siendo el representante principal la AEA (araquidonil etanolamida o anandamida) (Fig.I.8) [49]. Además existen otros componentes como:

- 2-Araquidonil glicerol(2-AG) (Fig.I.3)
- 2-Araquidonil gliceril éter noladin (noladin éter) (Fig.I.3)
- Araquidonil-2-cloroetilamida o ACEA (Fig.I.27)
- Araquidonil ciclo propilamida o ACPA (Fig.I.28)
- Virodamina (Fig.I.3)
- N-Araquidonoil-dopamina (NADA) (Fig.I.9)
- Palmitoil etanolamida (PEA) (Fig.I.10)

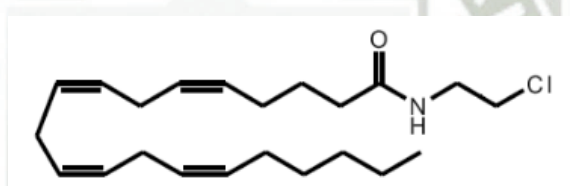


Figura I.27. Estructura química de ACEA.
Fuente: Elaboración propia.

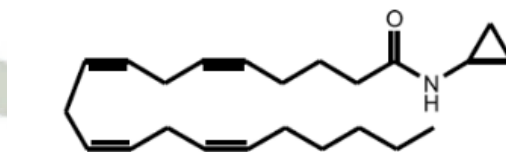


Figura I.28. Estructura química de ACPA.
Fuente: Elaboración propia.

2.2. Agonistas vanilloides

La capsaicina: 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida (Figura I.29), es el ingrediente activo de la guindilla (*Hot pepper*), es el principal agonista de receptores vanilloides VR. Fue aislada por primera vez por Thersh en 1846, en

1919 Nelson determinó su estructura química, y en 1930 se consiguió su síntesis completa [6,22].

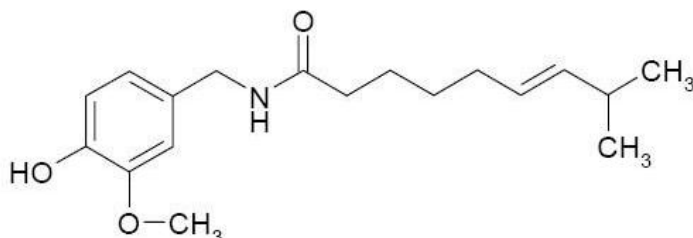


Figura I.29. Estructura química del 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida.

Fuente: Elaboración propia.

La anandamida se comporta también como un agonista vanilloide. La similitud funcional vanilloide entre capsaicina y anandamida para activar los receptores VR ha abierto un gran debate y múltiples ensayos farmacológicos para dilucidar esta controversia.

Este receptor es también activado por otros vanilloides, por R(+)metanandamida y otros compuestos cannabinoides. También se ha sugerido que uno de los productos de la degradación de anandamida, el ácido araquidónico, al ser metabolizado por la enzima lipooxigenasa da lugar a metabolitos como el 12-hidroxi-peroxi-eicosa-tetra-enoicos (12-HPETE) (Figura I.30) que podrían activar el receptor VR₁ [19,24].

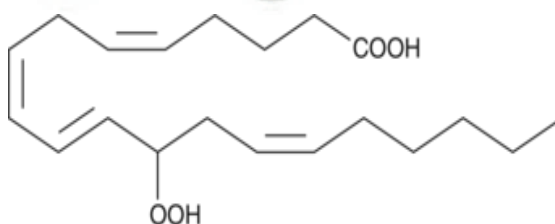


Figura I.30. Estructura química del 12-hidroxi-peroxi-eicosa-tetra-enoicos (12-HPETE).

Fuente: Elaboración propia.

2.3. Antagonistas cannabinoides/ Agonistas inversos

Con respecto a los antagonistas de los receptores CB, son considerados a su vez como agonistas inversos, los cuales no solo bloquean el efecto del agonista, sino al actuar sin presencia del agonista nos dan el efecto contrario al agonista [50].

El primero en ser caracterizado y el más ampliamente utilizado como antagonista de los receptores CB₁ es el diarilpirazol SR141716A (Figura I.31), denominado posteriormente “Rimonabant” y en su forma de comercialización clínica “Acomplia®” [51]. Este compuesto exhibe una marcada selectividad por los receptores CB₁ frente a los CB₂, y es capaz de prevenir y/o revertir las acciones de los agonistas CB que actúan a través de CB₁ tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* [52]. En cuanto a su especificidad, esta es dosis-dependiente; el SR141716A a altas concentraciones es capaz de bloquear el receptor de vanilloides VR₁, activar directamente canales de K⁺ e inhibir de manera no selectiva la movilización de Ca⁺⁺ en arteriolas cerebrales de conejo [53].

Otros antagonistas de los receptores CB₁ son:

- AM-251(Diarilpirazol) (Figura I.32)
- AM-281 (Diarilpirazol) (Figura I.33)
- AM-630 (Benzofurano) (Figura I.34)
- SR147778 (“Surinabant”) (Figura I.35)
- LY320135 (Benzofurano) (Figura I.36)

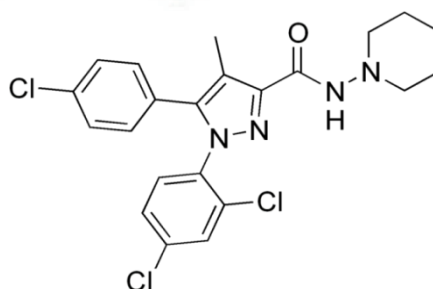


Figura I.31. Estructura química del SR141716A.

Fuente: Elaboración propia.

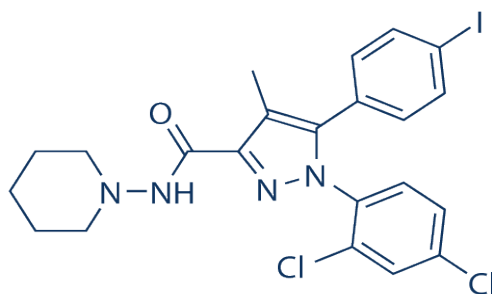


Figura I.32. Estructura química del AM-251.

Fuente: Elaboración propia.

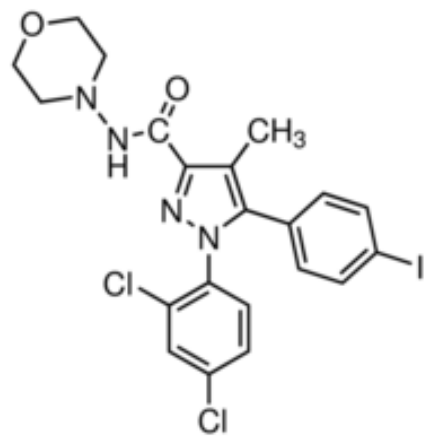


Figura I.33. Estructura química del AM-281.

Fuente: Elaboración propia.

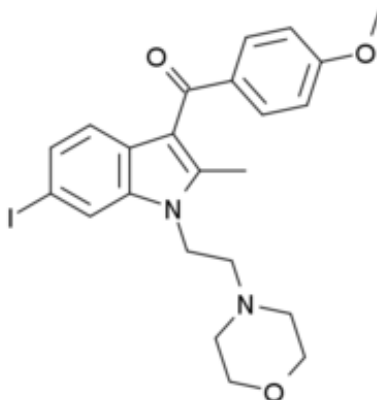


Figura I.34. Estructura química del AM-630.

Fuente: Elaboración propia.

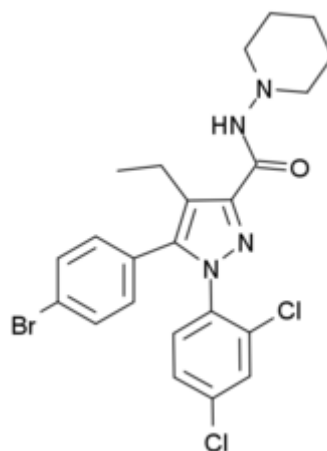


Figura I.35. Estructura química del SR147778.

Fuente: Elaboración propia.

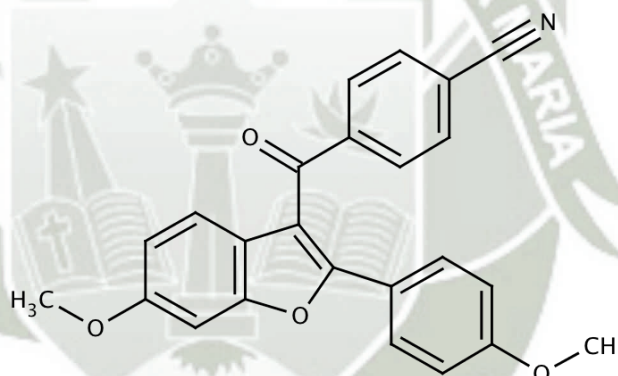


Figura I.36. Estructura química del LY320135.

Fuente: Elaboración propia.

En relación con los antagonistas del receptor CB_2 , la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo de este tipo de receptor es otro diarilpirazol, el SR144528 (Figura I.37). El SR144528 autoactiva receptores CB_2 e inhibe la actividad de proteínas G_i [51].

Otro antagonista de los receptores CB_2 es:

- O-1184 (Cannabinoide clásico) (Figura I.38)

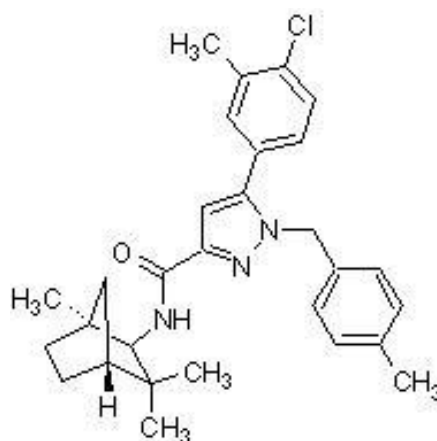


Figura I.37. Estructura química del SR144528.

Fuente: Elaboración propia.

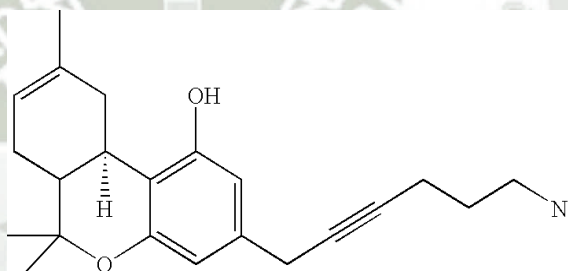


Figura I.38. Estructura química del O-1184.

Fuente: Elaboración propia.

2.4. Antagonistas vanilloides

La capsazepina: n-2-(4-clorofenil)etilico-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2h-2-benzazepine-2-carbothioamide (Figura I.39), es el más conocido antagonista competitivo del receptor VR_1 . Su uso está limitado por su potencia moderada, ya que a concentraciones micromolares (las necesarias para inhibir las respuestas de capsaicina) también bloquea canales de Ca^{++} y receptores nicotínicos [22,24]. El antagonista SR141716A (Figura I.31), a concentraciones superiores a $10\mu M$, de una manera inespecífica, inhibe la respuesta vasodilatadora a capsaicina mediada por VR_1 [25].

Algunos estudios sugieren que existen receptores VR insensibles a capsazepina y otros sugieren la existencia de un receptor de naturaleza

vanilloide, sensible a capsazepina y a SR141716A, que sería activado tanto por capsaicina como por los cannabinoides WIN55,212-2 (Fig.I.26) y CP55,940 (Figura I.40) [25].

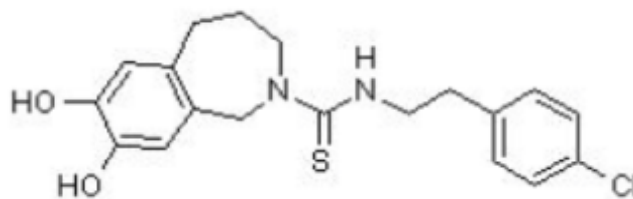


Figura I.39. Estructura química deln-2-(4-clorofenil)etílico-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2h-2-benzazepine- 2-carbothioamide.
Fuente: Elaboración propia.

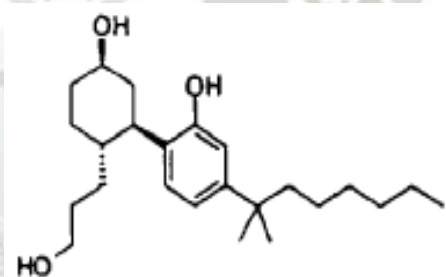


Figura I.40. Estructura química del agonista CP55,940.
Fuente: Elaboración propia.

3.EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES

3.1. Efectos fisiológicos y farmacológicos

Las bases moleculares de los efectos fisiológicos de eCB han comenzado a conocerse recientemente. En el SNC, los eCB participan en la regulación de la sensación dolorosa (cerebro y médula espinal), actividad motora, aprendizaje, memoria, y desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral [54]. Además están implicados en la regulación del vómito, apoptosis neuronal y neuroprotección.

Periféricamente disminuyen la presión intraocular y regulan la ingesta de comida.

Los dos mecanismos más estudiados son la interacción con sus receptores y la modulación de otros sistemas neurotransmisores. Pueden regular sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos, relacionados con el control de la actividad motora. También interaccionan con aminoácidos neurotransmisores, relacionados en el control de la actividad motora como el ácido- γ -amino butírico (GABA), también en la memoria y el aprendizaje con el glutamato (Glu). Su interacción con el sistema opioide, contribuye al control de la nocicepción y ha sido ampliamente estudiado [55].

3.1.1. Efectos psicoactivos

Los derivados de la planta Cannabis Sativa L., se han utilizado como droga de uso recreacional durante más de 4000 años, debido a sus efectos agudos sobre la esfera cognitiva y fisiológica [56]. De hecho, la principal dificultad técnica para el uso terapéutico de los CB es la incapacidad de separar los efectos colaterales psicotrópicos indeseables de los efectos terapéuticos beneficiosos.

Los CB producen un síndrome característico en los humanos que incluye: pérdida de memoria a corto plazo, desordenes cognitivos, alteraciones en la percepción del tiempo, alteraciones del humor, reducción de la capacidad de centrar la atención y de filtrado de la información irrelevante, descoordinación y somnolencia [57]. Estos efectos dependen tanto de la dosis administrada como de la pauta de administración (aguda o crónica).

Después de una dosis media, los efectos centrales son fácilmente cuantificables y medibles durante unas horas, generalmente no más allá de 4 a 6 horas [58]. Algunos estudios describen que los efectos cognitivos permanecen más allá de 24 horas, incluso después de una única dosis fumada o ingerida por vía oral [59].

Los niveles plasmáticos de Δ^9 -THC y otros cannabinoides correlacionan mal con la intensidad y el tipo de intoxicación [60]. La mayoría de los efectos mentales adversos suelen aparecer tras consumos prolongados, aunque en algunos sujetos sensibles, predispuestos o inexpertos pueden producir tras su administración aguda; episodios breves de ansiedad, pánico, trastornos disfóricos, depresivos, despersonalización, desrealización, conductas autoagresivas, delirios y/o alucinaciones [58,59,61].

En los animales de experimentación, los efectos centrales de los CB se manifiestan en la llamada tetraida cannabinoide: hipotermia, hipoquinesia, analgesia y catalepsia [62]. Tanto en animales como en humanos, los efectos psicótropos se alcanzan con dosis agudas relativamente altas [63]. En cambio, dosis mucho más bajas, que se han mostrado eficaces para reducir la hiperalgesia en el dolor neuropático, parecen no ocasionar efectos adversos agudos de importancia en el SNC [64].

3.1.2. Efectos sobre la sensación dolorosa

Probablemente, una de las funciones del sCBe sea la de modular la transmisión dolorosa por disminución de la respuesta sensorial de las neuronas en el tracto espinotalámico [58]. Así mismo suprimen la hiper-excitabilidad neuronal, hiperalgesia y alodinia a través de receptores CB_1 y CB_2 .

En modelos experimentales los CB son analgésicos tanto en dolores agudos inflamatorios como neuropáticos [59].

Se postulan 4 mecanismos de acción mediante los cuales los CB producen su efecto antinociceptivo:

3.1.2.1. Efectos mediados a través de receptores cannabinoides:

- a. **CB_1** : Se ha demostrado que la administración a ratones del antagonista cannabinoide SR 141716A produce hiperalgesia, lo que sugiere la

existencia de un tono cannabinoide basal, cuya inhibición sería la responsable de esta hiperalgesia [60].

- b. **CB₂**: La estimulación de estos receptores inhibe las respuestas dolorosas [61] por lo que el uso de agonistas CB₂ puede ser una posibilidad para el tratamiento de dolores tanto agudos como crónicos sin efectos psicoactivos. Esto sería especialmente relevante para el tratamiento de dolores neuropáticos [62].

3.1.2.2. Efectos mediados a través de receptores vanilloides VR₁

Los receptores vanilloides están involucrados en dolores agudos y crónicos tanto a nivel espinal como periférico. Hay evidencia de interacción entre receptores CB₁ y VR₁ [63].

3.1.2.3. Por interacción con el Sistema opioide:

El Δ^9 -THC libera dinorfina A e interacciona con canales de K⁺ liberando endorfinas [64]. Además, los CB actúan sobre receptores kappa opioides, ya que tanto la naloxona como la norbinaltorfimina, (antagonista opioide kappa) bloquean la antinocicepción producida por Δ^9 -THC de forma dosis-dependiente [65].

3.1.2.4. Modulando la liberación y actividad de neurotransmisores:

Especialmente noradrenérgicos y glutamatérgicos, alterando la percepción del estímulo doloroso [66].

3.1.3. Actividad locomotora

La alta densidad de receptores CB₁ en los ganglios basales, cerebelo; y la presencia en grandes cantidades de AEA y 2-araquidonilglicerol, sugieren un

papel importante del sCBe en el control de los movimientos voluntarios y por tanto en los trastornos motores [17].

Los receptores CB₁ se localizan presinápticamente en neuronas estriadas, cerebelo y corteza cerebral. Los eCB modulan la liberación y recaptación de GABA y Glu [67] y producen efectos indirectos sobre dopamina, afectando sobre todo a la síntesis de este neurotransmisor [68].

3.1.4. Emesis

Controlan el vómito actuando sobre receptores CB₁ localizados en el centro del vómito del tronco cerebral en el SNC, y en las terminaciones nerviosas de los plexos mientérico y submucoso del estómago, duodeno y colon, disminuyendo la motilidad por bloqueo de la liberación de acetilcolina en esas áreas [69].

3.1.5. Proliferación celular

Tanto la AEA como el 2-araquidonilglicerol ejercen acciones antiproliferativas en cultivos celulares de células tumorales [70]. Modulan varias vías de crecimiento celular como protein-quinasas activadas por agentes mitógenos y las kinasas activadas por estrés, que tienen un papel importante en el control del crecimiento celular y su diferenciación.

En células de glioma los CB producen apoptosis a través de los dos tipos de receptores CB. El efecto parece estar mediado en parte por ceramidas, con implicación especial del receptor CB₁ de cannabinoides y del receptor vanilloide VR₁ [71].

3.1.6. Efectos Neuroprotectores

Los agonistas CB son capaces de reducir la excitotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo por tanto, potenciales agentes neuroprotectores. La

capacidad de los CB de inhibir la neurotransmisión glutamatérgica, permitiría asegurar que el sCBe juega un papel fundamental en la regulación de la neurotransmisión excitadora y por tanto, también, de la excitotoxicidad [67].

El efecto neuroprotector de los CB se ha demostrado con dos agonistas cannabinoides WIN55,212-2 y CP55940 [48]. Ambos protegen de la muerte neuronal inducida por glutamato en cultivos celulares de neuronas de hipocampo. Aunque este efecto es bloqueado por SR141716A, no ha sido demostrado que el receptor implicado sea el CB₁, lo que sugiere la presencia de otro subtipo de receptor de naturaleza cannabinoide y sensible a SR141716A [72]. También se ha propuesto que los agonistas CB₁ sean neuroprotectores por su capacidad antioxidante.

3.1.7. Efectos sobre el metabolismo energético y la ingesta de alimento

Desde hace siglos se conocen los efectos estimulantes de los CB sobre el apetito y con ese fin han sido utilizados en distintas épocas y países. Los CB participan en la regulación del metabolismo energético tanto a nivel central (hipotálamo y sistema límbico) como periférico [13,14]. Así, a nivel central, los CB actúan a través de receptores CB₁ a nivel del hipotálamo y en otras áreas límbicas [72].

A nivel periférico los CB regulan el metabolismo lipídico en el tejido adiposo y en hígado también mediante la actuación de receptores CB₁ [73], mientras en el páncreas influyen en la regulación de la secreción de insulina a través de CB₁ y CB₂.

En músculo la activación CB₁ disminuye el gasto energético y la captación y oxidación de glucosa. Por último, los CB a través de los receptores CB₁ participan en la motilidad y secreción gastrointestinal [15,17].

La obesidad es un creciente problema de salud pública cuyas opciones de tratamiento farmacológico son bastante limitadas. En julio de 2006, las autoridades reguladoras de la unión europea aprobaron el uso de rimonabant (el antagonista selectivo CB₁ SR141716A) para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, en junio de 2007 fue retirado por la FDA debido a los problemas psiquiátricos que originaba [51].

Anorexia y caquexia son dos procesos que acompañan frecuentemente a pacientes con neoplasias avanzadas, infección por VIH, cuadros depresivos, anorexia nerviosa o enfermedad de Alzheimer [74]. En estos casos existen escasas alternativas eficaces, por lo que los agonistas cannabinoides son una opción terapéutica interesante. Varios estudios confirman que pueden ser útiles en pacientes con SIDA [75], cáncer [76] o alzheimer [77]. Sin embargo, aún se dispone de pocos estudios clínicos con una metodología adecuada y de datos fiables sobre la seguridad y tolerancia de estos preparados.

Los estudios en animales apoyan un efecto estimulante del apetito de los agonistas cannabinoides y un efecto anorexigénico de los antagonistas CB₁. Sin embargo, estos modelos animales han ocasionado algunos resultados discrepantes, debido principalmente a que cuando se administran dosis elevadas predomina el efecto sedante, así como también a diferencias en el fármaco utilizado y en los protocolos de administración [78].

Además, los niveles de eCB aumentan o disminuyen con la ingesta o en situaciones de insuficiencia alimentaria. Los agonistas cannabinoides incrementan, además, la frecuencia de la ingesta y posiblemente el valor hedónico de la comida, reforzando la preferencia por alimentos más apetitosos [79].

4. APOPTOSIS INDUCIDA POR CANNABINOIDES

En 1994, la AEA, un ligando del receptor cannabinoide endógeno fue mostrado para inducir la apoptosis en cultivos de linfocitos humanos. Este

estudio también se extendió a murino macrófagos y células T, mostrando que el tratamiento de Δ^9 -THC de células inmunes cultivadas activa la apoptosis a través de la regulación de la actividad de Bcl-2 [74].

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada que puede ser inducida por factores intrínsecos, factores extrínsecos o ambos. Debido a que la apoptosis elimina las células dañadas, dañinos y no deseados, es significativo en los procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la morfogénesis y la homeostasis [75].

Hoy en día se encuentra bien establecida la capacidad del Δ^9 -THC y de otros ligandos de los receptores de CB para atenuar los efectos secundarios asociados a determinados tratamientos antitumorales. En los últimos años por diversos laboratorios han puesto de manifiesto que la unión de Δ^9 -THC (o de otros compuestos cannabinoides) a los receptores de CB es capaz de reducir el crecimiento de tumores derivados de diversos tipos de células tumoral es incluyendo: glioma (el tipo más frecuente de tumor cerebral), cáncer de próstata, cáncer de páncreas y carcinoma hepático, abriendo la puerta a la posible utilización de estos compuestos como fármacos antitumorales [76].

El efecto antitumoral de los CB se basa fundamentalmente en la capacidad de estos compuestos para inducir la muerte de las células tumorales. La cascada de eventos que lleva a la activación de este proceso por los CB se da de manera temprana tras la activación de los receptores de CB en las células tumorales en la estimulación de la biosíntesis de esfingolípidos (una familia de lípidos que desempeña un importante papel estructural y señalizador en la célula) y su acumulación en el orgánulo donde tiene lugar dicho proceso: el retículo endoplasmático (RE) [74,76].

En el RE se dan funciones de gran importancia para la célula entre las que se encuentran la propia síntesis lipídica, la síntesis y plegamiento de proteínas o el almacenamiento de calcio. Cuando este orgánulo sufre algún tipo de alteración se activan una serie de mecanismos, denominados de manera genérica respuesta al estrés de RE, que tienen como objetivo restablecer el normal funcionamiento

del RE. Sin embargo, en ocasiones, la intensidad o duración del estímulo que origina la alteración hace que la ruta de respuesta a estrés de RE conduzca a la activación de la muerte celular programada [77]. En dicha ruta desempeñan un papel destacado dos proteínas denominadas p8 (un factor de transcripción que controla la expresión de otras proteínas) y una de sus dianas, TRB3 [78].

El tratamiento con cannabinoides origina un aumento en los niveles de estas dos proteínas, lo que conduce a la inhibición de otro importante complejo señalizador denominado mTORC1 (*“mammalian target of rapamycin complex 1”*) y a la activación de un proceso celular que dicho complejo controla, la autofagia [78]. En circunstancias normales la autofagia actúa proporcionando nutrientes a las células y es por tanto un proceso que participa en el normal funcionamiento de las mismas. Sin embargo, al igual que ocurría en el caso del estrés de RE, la autofagia puede tener también un papel inductor de muerte celular. Así, el tratamiento con cannabinoides activa la autofagia de manera que este proceso conduce a la activación de la apoptosis y a la muerte de las células tumorales (Figura I.41) [77].

Es importante destacar que estos efectos de los CB son selectivos de las células tumorales ya que el tratamiento con estos compuestos no promueve ni la acumulación de ceramida, ni la activación de la ruta relacionada con el estrés de RE, ni la autofagia, ni la apoptosis en células no transformadas [77].

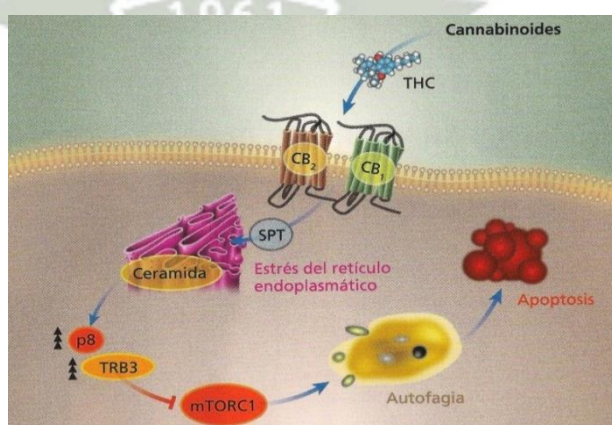


Figura I.41. Mecanismo de acción antitumoral de los cannabinoides.

Fuente: <https://piedrapsilosofal.wordpress.com/2012/01/15/el-efecto-antitumoral-de-los-cannabinoides>.

5. GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Cualquier tumor que se forme en las células gliales (del griego “glía”, que significa pegamento), o en tejido de sostén, del cerebro se denomina “glioma”. Un tipo de glioma es el astrocitoma (Figura I.42). Los astrocitomas toman su nombre de los astrocitos, las células en forma de estrella de las cuales crecen [79].



Figura I.42. Astrocito.

Fuente: American Brain Tumor Association.

Los astrocitomas son tumores compuestos principalmente por astrocitos anaplásicos y se clasifican en cuatro grados, según su nivel de malignidad, de acuerdo con la OMS:

- Astrocitoma pilocítico (Grado I).
- Astrocitoma de bajo grado (Grado II).
- Astrocitoma anaplásico (AA) (Grado III).
- Glioblastoma multiforme (GBM) (Grado IV).

La OMS publicó en 2007 una nueva revisión de la clasificación de los tumores del SNC en la que se incluyen nuevas entidades patológicas así como variaciones de las ya existentes [80].

El GBM es el más común y más maligno de los tumores cerebrales en adultos, constituyendo el 50% de todos los gliomas. Este tipo de tumores fueron descritos por primera vez por Rudolf Virchow en 1863, recibiendo la denominación de “espongioblastoma”. Posteriormente se cambió el término por

el de “glioblastoma”. El término “multiforme” hace referencia a la heterogeneidad celular que presentan [1].

El GBM se localiza, en la mayoría de los casos, en los hemisferios cerebrales, en especial en los lóbulos frontal y temporal. Se mostró en un estudio con 267 pacientes adultos con GBM que, en la mayoría de los casos, la localización es multilobular, en parte debido a la migración de las células tumorales a través de estructuras mielinizadas, principalmente el cuerpo caloso, que proporcionan a la lesión un aspecto similar a una mariposa. Los principales síntomas que presentan los pacientes incluyen dolor de cabeza, cambios en la personalidad y elevada presión intracraneal [1,2].

En la Figura I.43. Se evidencia una pequeña lesión cortical evoluciona rápidamente hacia una gran masa tumoral.

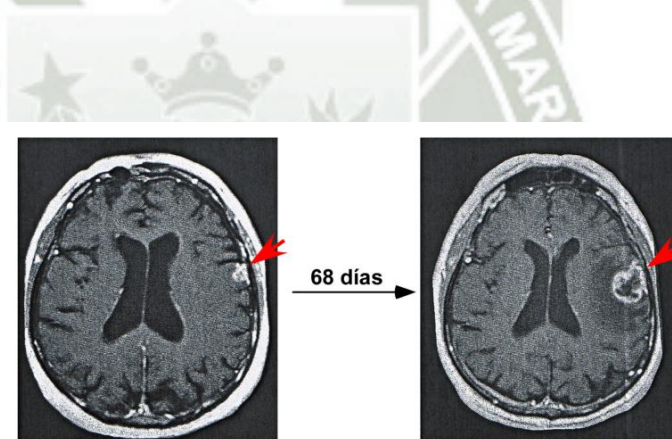


Figura I.43. Imagen de resonancia magnética de un Glioblastoma Primario.

Fuente: Stewart and Kleihues, 2003 of Cancer Report.

Desde el punto de vista histológico, el GBM presenta una amplia variedad de alteraciones, como son la necrosis, las hemorragias ocasionales, la prominente proliferación vascular, la aparición de células gigantes, el polimorfismo nuclear o la elevada actividad mitótica [4].

Según la clasificación hecha por Scherer en el año 1940, existen dos grandes tipos de GBM:

- GBM primario
- GBM secundario

Aunque morfológica y clínicamente ambos tipos de GBM son indistinguibles, en realidad constituyen dos entidades diferenciadas, puesto que afectan a pacientes con diferentes edades, se desarrollan a través de rutas genéticas distintas, presentan diferentes patrones de expresión de proteínas y RNA; sus respuestas a radio y quimioterapia varían [5].

- a. **El GBM primario:** Es mucho más frecuente que el GBM secundario y se caracteriza por la ausencia de un astrocitoma maligno preexistente, es decir, que surge *de novo*. La incidencia es mayor en personas de edad avanzada, concretamente el pico está entre los 60-70 años, el tiempo durante el cual progresa y se desarrolla la enfermedad es muy corto, alrededor de 1 año [4,5].
- b. **El GBM secundario:** se desarrolla más lentamente y lo hace a partir de astrocitomas de menor grado, como el astrocitoma de bajo grado (grado II) o el astrocitoma anaplásico (grado III), que progresan durante un período de unos 4 ó 5 años hasta el GBM secundario. El mayor pico de incidencia en estos tumores está en torno a los 40-50 años [4,5].

En la Figura I.44. Se evidencia la evolución de los Glioblastomas, aunque histológicamente son indistinguibles los Glioblastomas primarios y secundarios; evolucionan de forma diferente, presentando diversas alteraciones genéticas y moleculares y apareciendo en diferentes grupos de edad. **TP53:** gen que codifica la proteína p53. **CDKN2:** gen que codifica la proteína p16. **CDK4/6:** kinasa dependiente de ciclinas 4/6. **LOH:** pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10. **PTEN:** gen que codifica el homólogo de tensina y fosfatasa. **EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico. **MDM2:** murine double minute 2.

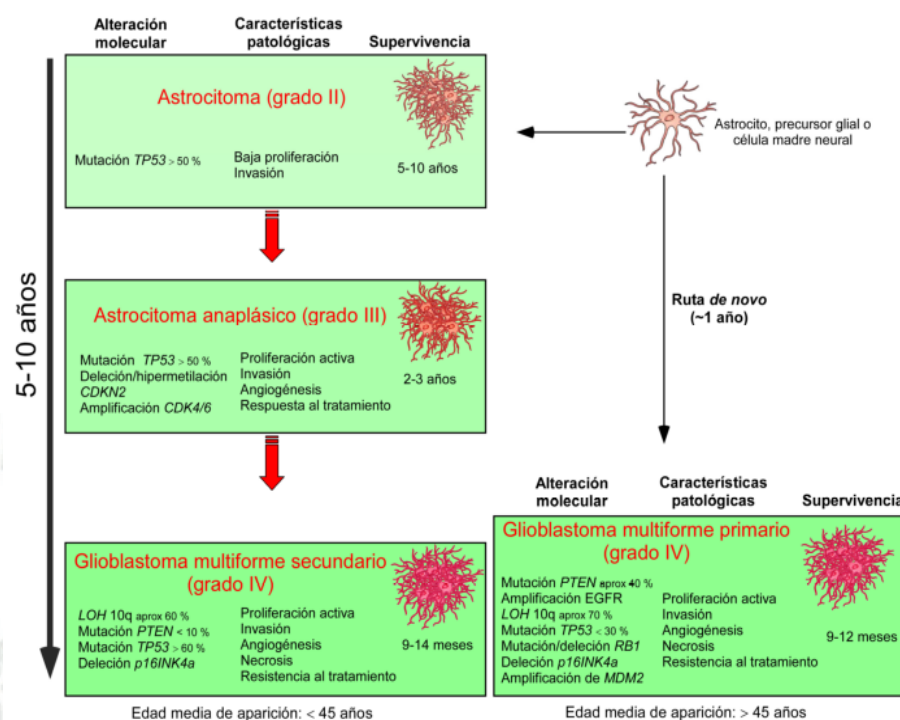


Figura I.44. Alteraciones y modo de evolución de los Glioblastomas primarios y secundarios.

Fuente: Elaboración propia.

5.1. Tratamiento

El tratamiento actual del Glioblastoma multiforme es una combinación de diferentes modalidades de tratamiento, tales como la cirugía, radiación y quimioterapia con temozolamida.

5.1.1. Cirugía

Uno de los pilares de la neurocirugía oncológica es obtener una sobrevida con una importante resección de la lesión tumoral.

Los objetivos de la cirugía son obtener tejido tumoral para el diagnóstico y la planificación del tratamiento, extirpar la mayor cantidad posible de tumor y reducir los síntomas provocados por la presencia del tumor. En algunas circunstancias, como por ejemplo determinadas afecciones o preocupaciones

médicas sobre la ubicación del tumor, se puede realizar una biopsia en lugar de una cirugía [81,82].

Debido a la ubicación del tumor, donde se puedan ver afectados el movimiento, la sensibilidad o el habla, algunos tumores no pueden ser extirpados en su totalidad. Se puede realizar una extirpación parcial del tumor para disminuir la inflamación en el cerebro o para reducir la actividad convulsiva [81].

La cirugía para extirpar un tumor cerebral se lleva a cabo realizando una abertura en el cráneo sobre el tumor, lo que se conoce como craneotomía. El cirujano tiene a su disposición varias piezas de instrumental especializado. El mapeo del cerebro y las MRI funcionales ayudan al neurocirujano a determinar dónde se encuentran las áreas vitales del cerebro y así evitarlas durante la cirugía. El cirujano puede usar equipo computarizado estereotáctico, técnicas guiadas por imagen o MRI intraoperatorias como instrumentos de navegación, algo muy parecido a un sistema GPS [81,82].

Estas herramientas ayudan a guiar el acceso del neurocirujano a algunas áreas difíciles o profundas en el cerebro. Se pueden usar distintos láser durante la cirugía para vaporizar células tumorales. Los aspiradores ultrasónicos son instrumentos que pueden dividir y succionar el tumor. Los microscopios de alta potencia ayudan al neurocirujano a ver mejor el tumor [81].

Debido a que las células de un astrocitoma, similares a tentáculos, crecen dentro del tejido circundante, estos tumores no se pueden extirpar en su totalidad.

5.1.2. Radioterapia

La utilidad de la radioterapia ha demostrado eficacia cuando se ha agregado a la cirugía y quimioterapia, prolongando la sobrevivencia de los pacientes. La

radiación convencional para los astrocitomas de grado alto generalmente se dirige al sitio del tumor y al área que lo rodea [4,5].

5.1.3. Quimioterapia

Para los GMB recién diagnosticados, se administra un ciclo de seis semanas de temozolomida conjuntamente con radiación. La temozolomida (Figura I.45) es un agente alquilante con una penetración razonable de la barrera hematoencefálica. Algunos oncólogos recomiendan tomar temozolomida una hora antes de la radioterapia para maximizar su supuesto efecto radio sensibilizador, aunque por motivos prácticos la administración a la hora de dormir podría ser más viable para algunos pacientes [4,81].

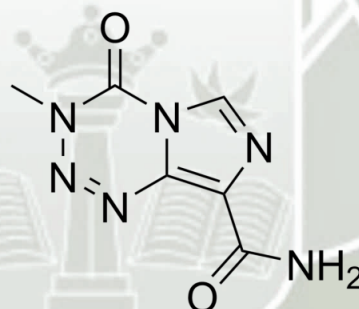


Figura I.45. Estructura química del 4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida.

Fuente: Elaboración propia.

5.1.3.1. Temozolamida

La temozolomida (TMZ) es un agente alquilante activo por vía oral. La TMZ es un imidazotetrazina de segunda generación y es el análogo metilado de la mitozolomida. Debido a la toxicidad hematológica impredecible y a veces grave de la mitozolomida, la TMZ es el primer agente desarrollado de este grupo utilizado clínicamente. La TMZ y dacarbazina se metabolizan en el mismo compuesto activo. La TMZ muestra una actividad significativa en los gliomas

malignos, incluyendo el astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme [9,83].

Mecanismo de acción: La TMZ es un profármaco de un agente citotóxico alquilante. A pH fisiológico, la TMZ sufre una rápida conversión no enzimática para formar el metabolito activo, la monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC) (Figura I.46). Los efectos citotóxicos de MTIC implican la alquilación (metilación) del ADN en varios lugares de la guanina. La formación de O [6]-metilguanina inhibe la replicación del ADN y causa la muerte celular a través de la estimulación de la proteína p53. La TMZ es un inhibidor del ciclo celular no específico, teniendo lugar la detención del ciclo celular entre las fases G2-y M. La combinación de la TMZ y radioterapia resulta en efectos aditivos. La resistencia a la TMZ puede ser debida a la sobre expresión de la enzima de reparación del ADN, (6)-metilguanina ADN-metil transferasa) y la pérdida de reparación del ADN desajuste [84].

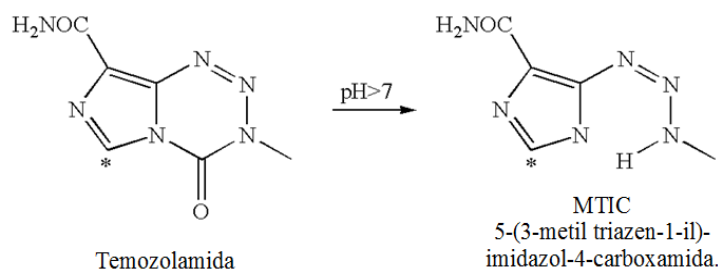


Figura I.46. Conversión del metabolito activo MTIC.

Fuente: Elaboración propia.

Farmacocinética: la TMZ se administra por vía oral, absorbiéndose rápida y completamente tras su administración oral. Las concentraciones plasmáticas máximas se producen dentro de una hora. Los alimentos reducen la velocidad y el grado de absorción de la TMZ. Las concentraciones plasmáticas máximas y las AUC disminuyen en un 32% y 9%, respectivamente, y el T_{máx} aumenta dos veces (de 1.1 a 2.25 horas) cuando la TMZ se administra después de un desayuno con un alto contenido en grasas [85].

La TMZ se hidroliza espontáneamente a pH fisiológico a un metabolito activo, 3-metil-(triazen-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC), y ácido temozolomida. MTIC se hidroliza a más de 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) y metilhidrazina, que se cree que las especies activas alquilantes. AIC se sabe que es un intermedio en la biosíntesis de purina y ácido nucleico (Figura I.47).

La TMZ exhibe una cinética lineal y una vida media de eliminación de 1,8 horas. Las enzimas del citocromo P450 desempeñan sólo un papel menor en el metabolismo de la TMZ y MTIC. Alrededor del 39% de la dosis radiactiva de la TMZ se recupera en la orina después de 7 días. La recuperación incompleta de la TMZ es probablemente debido a la incorporación de la AIC en ácidos nucleicos [84,85].

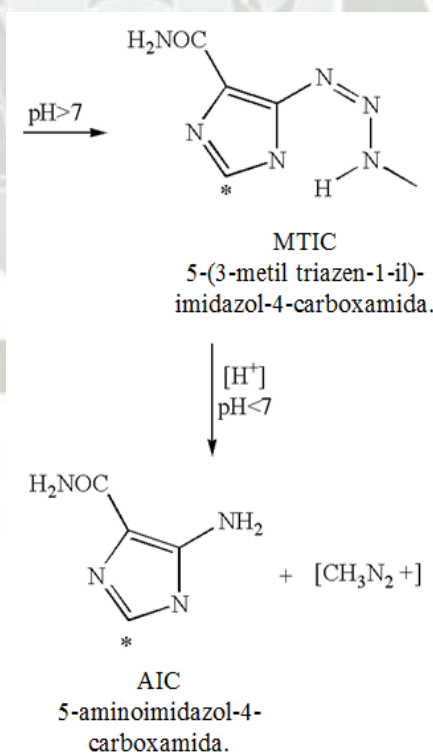


Figura I.47. Hidrólisis del MTIC a AIC y metilhidrazina.

Fuente: Elaboración propia.

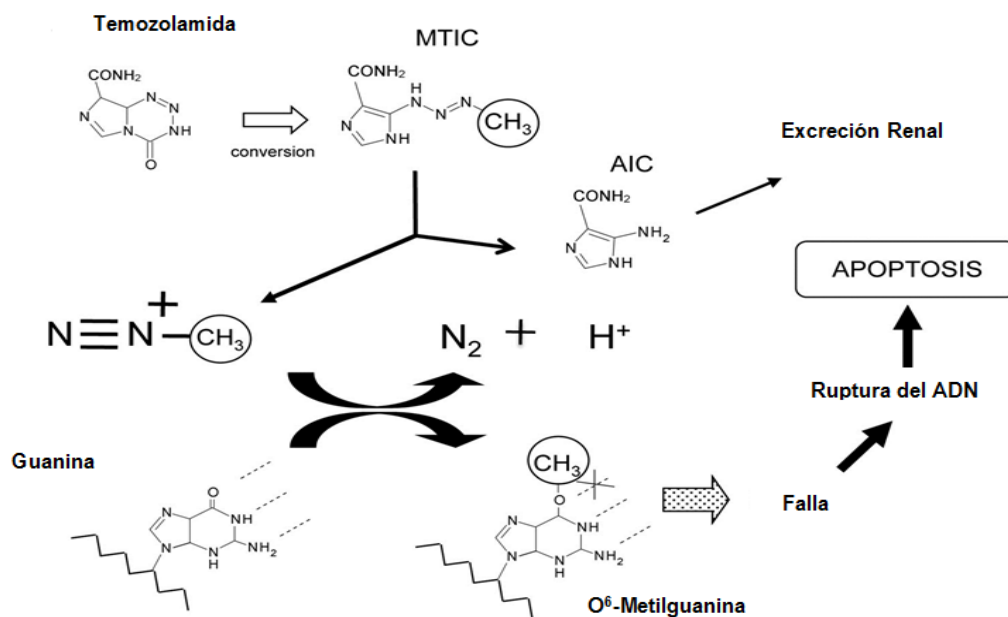


Figura I.48. Esquema general del mecanismo de acción de la temozolamida.
Fuente: Elaboración propia.

6. CULTIVOS CELULARES

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células "in vitro", manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Este es un método de experimentación que viene siendo utilizado por la investigación ya desde hace muchos años [86].

Es un modelo de estudio in vitro constituido por células que pueden crecer y mantenerse en suspensión o en monocapa por más de 24 horas en condiciones controladas. Esta técnica tiene la ventaja de un mayor control sobre los factores que puedan afectar el daño glial o los posibles mecanismos de acción de los agentes farmacológicos a utilizar; a comparación, de los modelos in vivo que tienden a complicarse cuando no se puede controlar factores como la variabilidad biológica y la evaluación de la eficacia farmacológica.

El uso de células de Glioblastoma multiforme humano T98G [11] y de rat glioma C6 entre otros tipos de células, han permitido el diseño de métodos eficaces para la investigación de drogas.

6.1. Medio de Cultivo

Actualmente se pueden utilizar ciertos medios con fórmulas definidas que incluyen factores de adhesión, inhibidores de proteasas, hormonas, factores de crecimiento, oligoelementos como Cu, Se y Fe, y proteínas. Existen un gran número de medios de cultivos diferentes que se diferencian en la calidad y cantidad de sus componentes. Algunos son de uso general y otros son muy específicos para el crecimiento de ciertas células. En la tabla I.3 se indican algunos de ellos [87].

Tabla I.3. Algunos Medios de Cultivo.

BME	Medio basal de Eagle
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
GMEM	Medio MEM de Glasgow
IMDM	Medio DMEM modificado por Iscove
L-15	Medio L-15 de Leibovitz
F-10	Medio F-10 de Ham
F-12	Medio F-12 de Ham
199	Medio 199

Fuente: <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>.

Para mantener las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se cultivaron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés *Dulbecco's modified eagle médium*), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) (v/v) y una

solución de 50UI/ml penicilina y 50 μ g/ml de estreptomicina al 1% (v/v). Siendo incubadas a 37°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ [88].

Se puede sembrar entre 1000 a 1000000 células por pozo en platos de 96 pozos y crecer hasta un 75-80% de confluencia por pozo. En este estado, las células, pueden ser expuestas a diferentes tipos de agentes nocivos para imitar los mecanismos de acción de lesiones que se cree, ocurren in vivo [88].

7. GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G

Las líneas de células inmortalizadas sirven como sistemas de modelo para el estudio del desarrollo neural y restauración de las funciones en modelos de enfermedades neurológicas. Recientemente, mediante técnicas de ingeniería genética se han producido líneas celulares con características específicas gracias a la inserción de genes en una célula inmortal pre-existente o mediante la inmortalización de células primarias [89].

Las líneas de células de neuroblastoma y glioma, obtenidas originariamente a partir de células tumorales únicas, suponen una oportunidad especial para investigar las diferencias que existen entre las neuronas y la glía. Las ventajas especiales se refieren a la producción de grandes poblaciones homogéneas de estas células mediante clonación, que pueden cultivarse en condiciones controlables y manipulables [90]. En 1974 Schubert y colaboradores afirmaron lo difícil que es trabajar con glías del Sistema Nervioso Central, se clonaron múltiples líneas celulares tanto gliales como neuronales ya que ensayar en estas muestras demanda muchos retos [91].

Estas líneas celulares comprenden diversos clones celulares neuronales tales como la línea C1300; células gliales centrales como los astrocitomas C6 y CHB; células gliales periféricas como las líneas tumorales de células de Schwann, RN-2; las líneas celulares de Glioblastoma multiforme como; A-172, GOS 3, T98G, LN405, SW1088, SW1783, CCF-STTG1, MOG-G-CCM, U-87 MG y U118[92].

Las dos líneas de células clonales, neuroblastoma C1300 y glioma C6, producen un amplio rango de proteínas específicas distintas, lo que destaca su naturaleza esencialmente diferente [90].

7.1. Modelo Farmacológico

La línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G (Figura I.49) fue originalmente establecida en 1979 de un tumor de Glioblastoma Multiforme de un varón de raza blanca de 61 años de edad [11]. En los cultivos de células gliales clonales se ha estudiado la biosíntesis y propiedades de diversas macromoléculas. En este sentido, se ha investigado la síntesis de la proteína S-100, la de los mucopolisacáridos, glucolípidos y diversas glucoproteínas, demostrándose que son idénticas a las encontradas en el cerebro *in vivo*. La acumulación de proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) es un rasgo característico de la gliosis astrocítica. El (-)-deprenil, un inhibidor específico de la monoamino oxidasa (MAO), disminuye la cantidad de mRNA GFAP en cultivos de glioma. Este estudio indica por lo tanto que el (-)-deprenil puede ser utilizado para regular la astrogliosis que sigue a daños en el Sistema Nervioso Central al igual que en algunas enfermedades neurodegenerativas [90,91,92].

La línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G ofrece ventajas como el fácil cultivo, gran densidad (Figura I.49), alta viabilidad y generaciones ilimitadas.

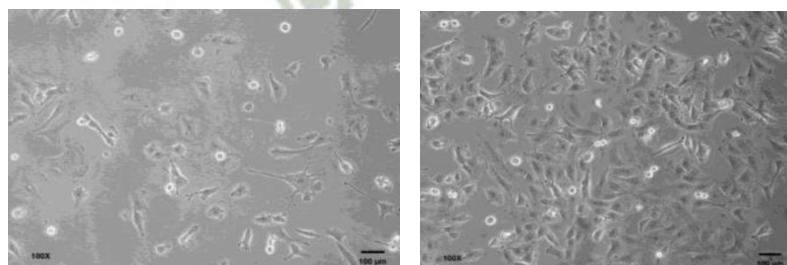


Figura I.49. Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Después de 2 días de desarrollo (izquierda, baja densidad), después de 4 días de desarrollo (derecha, alta densidad).

Fuente: ATCC® CRL 1960. [94]



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. Glioblastoma Multiforme Humano T98G

Se utilizó la línea celular de tumor Glioblastoma Multiforme Humano T98G que se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL 1960) [93], se encontró almacenada a una temperatura de -200°C en una cámara de nitrógeno líquido en los laboratorios de investigación de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

La muestra biológica se reconstituyó por incubación en medio de cultivo a condiciones adecuadas para su proliferación.

1.1.2. Cannabinoides

La muestra de cannabinoides como anandamida fue adquirida por Abcam® y WIN55,212-2 mesylate fue comprada de Sigma Aldrich.

1.1.3. Droga utilizada

La temozolamida fue obtenida en Sigma Aldrich, en la descripción del producto figura una pureza de 90%.



Figura II.1. Cámara de nitrógeno líquido.

1.2.MATERIALES DE LABORATORIO

1.2.1. Material descartable

- Pipetas de 5 y 10ml.
- Tubos de centrifuga de 45ml.
- Tubos de microcentrifuga (Eppendorf).
- Puntas desechables para micropipeta.
- Frascos para cultivo celular (Cell star®, greiner bio-one).
- Platos de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas (Costar® 3595).

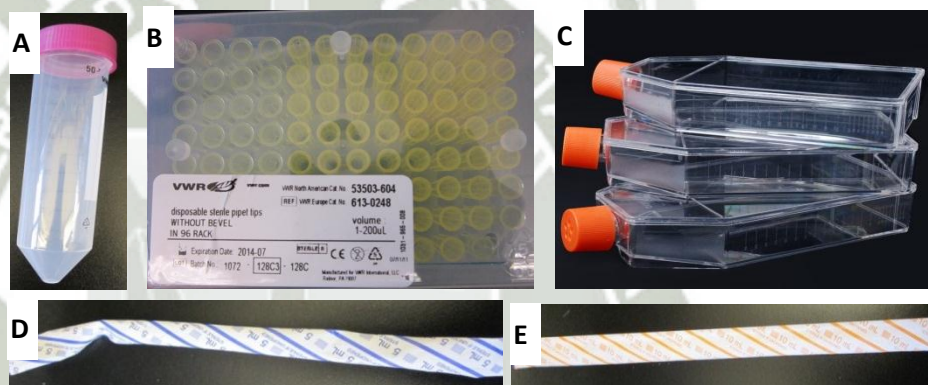


Figura II.2. Material descartable utilizado.

A:Tubo de centrifuga de 45ml; **B:**Plato de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas; **C:**Frascos para cultivo celular; **D:**Pipeta de 5ml; **E:**Pipeta de 10ml.

1.2.2. Material de vidrio

- Pipetas de 1, 5 y 10ml.
- Matraces de 100, 500 y 1000ml.
- Probetas de 500 y 1000ml.
- Vaso de precipitado de 50ml.
- Viales.

1.2.3. Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2).
- Cámara de incubación (Mettler®).
- Baño María (Fisher Scientific™).
- Sonificador de baño (VWR®, Symphony).
- Centrifugadora de laboratorio (Clay Adams™ Dynac™ III Centrifuge, Fisher Scientific™).
- Espectrofotómetro con lector de platos de 96 celdas (Synergy™ HT, Biotek®).
- Microcentrifugadora (Fisher Scientific™, Marathon 16KM).
- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31).
- Celulómetro o contador de células (Nexcelom BioScience®, AutoT4).
- Pipetas de ultra de alta performance (VWR®).
- Rotador (VWR®).
- Mezclador de contacto de laboratorio (Touch Mixer) (VWR®).



Figura II.3. Cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2).



Figura II.4. Espectrofotómetro con lector de platos de 96 celdas (Synergy™ HT, Biotek®).

1.2.4. Test de detección

- Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™ (Thermo Scientific).
- Kit Western Blot:
 - Sistema de detección Western™ONE-HOUR (Genscript).
 - Fuente de alimentación Power Pac™ HC (Bio-Rad).
 - Inhibidor de la proteasa (Thermo Scientific™ Halt).
 - Buffer de lisis celular (Thermo Scientific™ Pierce IP).
 - SDS-PAGE (Thermo Scientific™ Pierce).
 - Membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific™Pierce).
 - Protein ladder (ab116028, Abcam®).
 - Quimioluminiscente mejorado (ECL) Western blotting substrato (ab65623, Abcam®).
 - Sistema de imagen cuantitativo para quimioluminiscente (Alpha Innotech Fluor Chem®FC2 Imaging System, Multimage II® FC light cabinet).

1.2.5. Reactivos

- Solución de azul de tripán (Sigma Aldrich Co®).
- PBS = Buffer fosfato salino pH 7.4 (Sigma Aldrich Co®).
- DMSO = Dimetil sulfóxido (Sigma Aldrich Co®).
- DMEM = Dulbecco Modified Eagle Medium (ATTC®).
- Tripsina- EDTA (ATTC®).

- FBS = Suero fetal de bovino (ATTC®).
- MTS=([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolium) (ATTC®).
- Penicilina (50UI/ml).
- Estreptomicina (50µg/ml).
- RIPA = lysis buffer.
- SDS = Docecilsulfato.
- Running buffer.
- Transfer buffer.
- Blocking buffer 5% milk.
- Tween 20.
- TBST = Washing buffer (Tris-Buffer Saline Tween 10X, pH 7.4).
- TBE = 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.
- Stripping buffer 5X.
- Agua ultrapura.
- Agua destilada.

1.3.LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en los laboratorios de post-grado N° 200 de School of Pharmaceutical Sciences de *Massachusetts College and Health Science University* (MCPHS University), Boston, USA.



Figura II.5. Laboratorios de post-grado de School of Pharmaceutical Sciences de *Massachusetts College and Health Science University* (MCPHS University), Boston, USA.

2. METODOLOGÍA

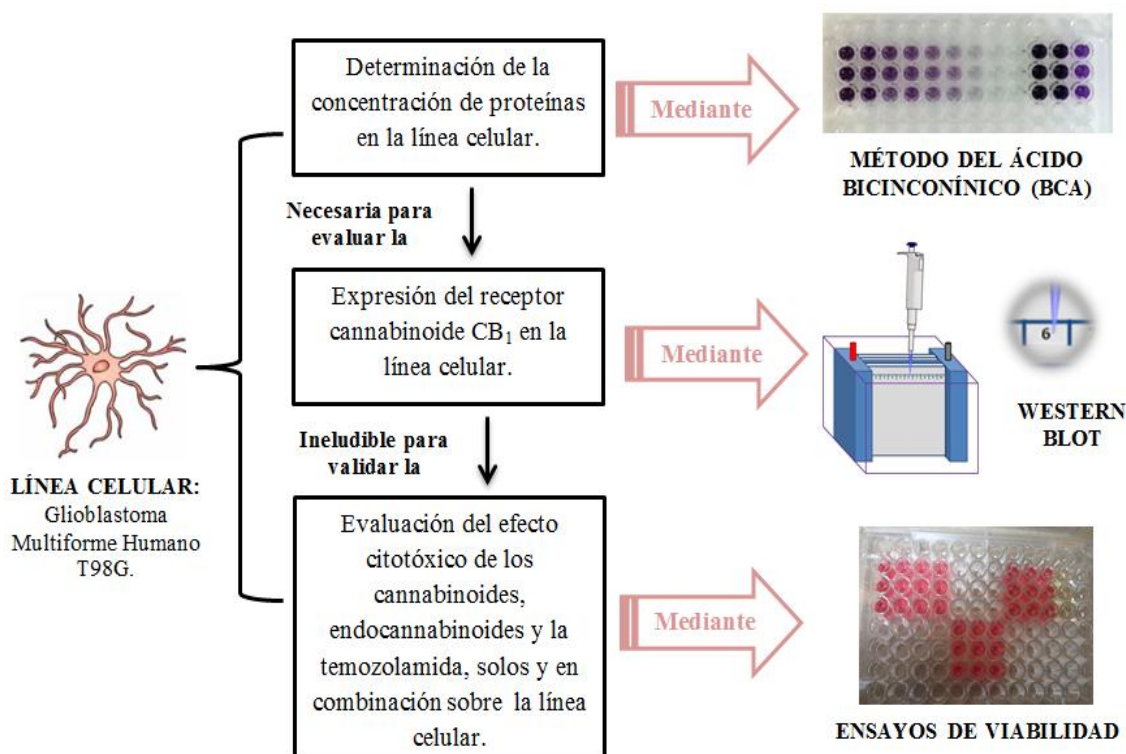


Figura II.6. Esquema general de la metodología empleada en la investigación.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura II.6, se muestra un esquema de los métodos usados para poder determinar el efecto citotóxico de los cannabinoides, endocannabinoides y la temozolamida, solos y en combinación sobre la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

2.1.CULTIVO DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G

Las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G, se encontraba almacenada en una cámara de nitrógeno líquido a -200°C [94]. Las células se cultivaron desde la primera generación en condiciones estériles en una cámara

de flujo laminar de presión positiva y constantemente se inhibió la proliferación microbiana con alcohol isopropílico al 70%.

Para conseguir la temperatura ambiente las células fueron colocadas en baño maría a 37°C y cuando estas alcanzaron la temperatura se sembraron en un frasco de incubación con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal de bovino (FBS) y estas células se incubaron a una temperatura de 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ [94]. Después de tres días, se evidencia crecimiento, llamándose a este el primer pasaje (Figura II.7). A partir de este se formaron nuevos pasajes.



Figura II.7. Frasco de incubación de la primera generación.

Para la generación de nuevos pasajes, se desechó el medio que contenía el frasco de incubación con el primer pasaje. Las células se encontraron adheridas a la base del frasco debido a la producción de colágeno, para separar las células de la base del frasco de incubación se desechó el medio contenido y se agregó 3ml de Tripsina-EDTA con una agitación ligera que luego se desecha. Después, se agregó otros 5ml de Tripsina-EDTA y este se encuba a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ por 12 minutos, moviéndola con una agitación ligera cada 4 minutos por 3 veces [94]. En este proceso se observó el desprendimiento de las células que se evidencia como una película grasa suspendida en el frasco.

Al finalizar el tiempo de incubación se agregó 10ml de medio DMEM sin FBS (medio MDEM blanco) mezclando con el contenido del frasco de

incubación. La suspensión se transfirió a un tubo para centrifuga de 50ml y se centrifugo a 1000rpm por 5 minutos. Después se obtuvo un pellet (precipitado de células) eliminando el medio sobrenadante y se volvió a resuspender con 10ml de medio DMEM enriquecido con 10% FBS [94], el medio debe mezclarse uniformemente con el pellet hasta que este pueda suspenderse dentro del medio, a esto se denomina suspensión de células. La suspensión final es la que se utiliza para realizar la siguiente generación o para estudios específicos.

2.1.1. Conteo de células viables

Para realizar estudios se debe contabilizar la cantidad de células obtenidas y su porcentaje de viabilidad. Para el conteo de células se sacó 20 μ L de la suspensión de células y esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf mezclando con 20 μ L de solución de azul de tripán, se agitó hasta lograr homogeneidad. De esta mezcla se colocó 20 μ L en una celda para conteo celular.

El celulómetro (contador de células) (Figura II.8) se configuró para el conteo de T98G, luego se colocó la celda para realizar el conteo de las células de Glioblastoma Multiforme humano T98G [94]. Por último, el equipo determinó el número de células por ml de medio y también se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular. Una cantidad óptima de células para poder realizar ensayos es de 1×10^6 células/ml con una viabilidad mayor del 95%.



Figura II.8. Celulómetro o contador de células (Nexcelom BioScience®, AutoT4).

2.2.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G.

Para realizar los ensayos correspondientes se evaluó si la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G contenía una óptima concentración de proteínas.

Para ello se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA). Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{2+} a Cu^{1+} . El ión cuproso Cu^{1+} producido se une a dos moléculas de BCA (Figura II.9) y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica de tal manera que ahora absorbe luz a 562 nm y aparece un color púrpura. Formación de color influenciado por cisteína, cistina, tirosina y triptófano. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente en un amplio rango de trabajo (20-2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

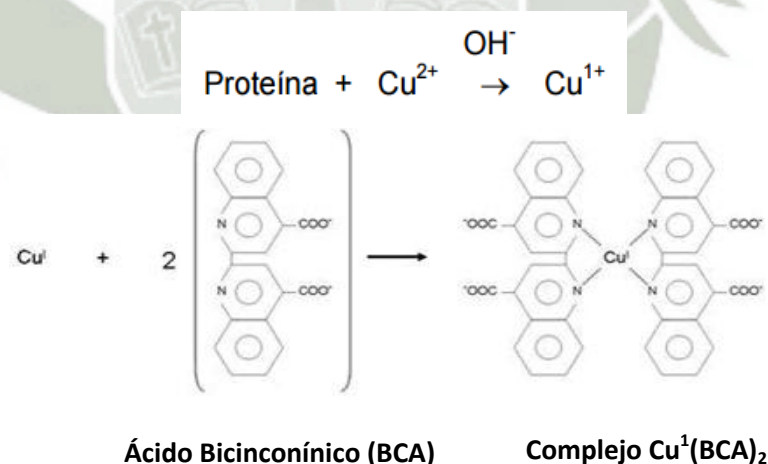


Figura II.9. Reacción del ensayo BCA.

Fuente: Elaboración propia.

2.2.1. Aislamiento de las proteínas de las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

Se colocó una generación de células (T98G) a tubos eppendorfs, luego se centrifugó las células durante 5 minutos a 1250rpm en 4°C. Al finalizar se desechó el sobrenadante, para obtener el peso de las células.

$$Peso_{células} = (Peso_{pellet} + Peso_{tubo\ eppendorf}) - Peso_{tubo\ eppendorf}$$

$$Muestra\ 1 \rightarrow 1.0093g - 0.9186 = 0.0907g$$

$$Muestra\ 2 \rightarrow 0.9556g - 0.9186 = 0.0370g$$

Al pellet se le adicionó 1ml (1000μL) de PBS frío (Buffer Fosfato Salino) PBS 1X cold. Se resuspendió las células y nuevamente se llevó a la centrifugadora durante 5 minutos a 3000rpm en 4°C. Al finalizar se desechó el sobrenadante y se adicionó 1000μL de PBS frío (este paso se realizó por dos veces). Después, se desechó el sobrenadante para adicionar lysis buffer RIPA (Ensayo Radio Inmuno Precipitación) con EDTA (inhibe las fosfatasa).

$$Muestra\ 1 \rightarrow Peso_{células} = 0.0907g + 100\mu LRIPA$$

$$Muestra\ 2 \rightarrow Peso_{células} = 0.0370g + 50\mu LRIPA$$

Posteriormente se incubó las muestras en hielo por un periodo de 30 minutos, colocando cada 10 minutos por 3 veces en el vortéx. Finalmente, se centrifugó por 10 minutos a 1300 rpm en 4°C.

Para el conteo de células viables se sacó 20μL de la suspensión de células y esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf mezclando con 20μL de solución de azul de tripán, se agitó hasta lograr homogeneidad. De esta mezcla se colocó 20μL en una celda para conteo celular. La suspensión de Glioblastoma Multiforme Humano T98G contenía:

$$M_1 \Rightarrow 1.09 \times 10^7 \text{ células/ml con una viabilidad de } 97.1\%.$$

$$M_2 \Rightarrow 5.75 \times 10^6 \text{ células/ml con una viabilidad de } 95.0\%.$$

2.2.2. Preparación de estándares diluidas de albúmina (BSA)

Se utilizó la Tabla II.1 como guía para preparar un conjunto de estándares de proteínas. Se vertió el contenido de una ampolla estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un vial limpio. Cada ampolla contenía 1ml (2mg/ml) de

estándar albúmina que fue suficiente para preparar las diluciones. Las diluciones se prepararon exactamente con las cantidades indicadas de la tabla con la ayuda de una micropipeta.

Tabla II.1. Preparación de estándares diluidos de Albumina (BSA).
(Rango de trabajo = 20-2,000µg/ml)

Vial	Volumen de diluyente Buffer BPS (µL)	Volumen y origen de BSA (µL)	Concentración final BSA (µg/ml)
A	0	300 del stock	2000
B	125	375 del stock	1500
C	325	325 del stock	1000
D	175	175 de la dilución del vial B	750
E	325	325 de la dilución del vial C	500
F	325	325 de la dilución del vial E	250
G	325	325 de la dilución del vial F	125
H	400	100 de la dilución del vial G	25
I	400	0	0 = Blanco

Fuente: Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™ (Thermo Scientific).

2.2.3. Preparación del reactivo de trabajo BCA (WR)

El Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™ contiene 2 reactivos, el BCA reactivo A y el BCA reactivo B.

-Reactivo A: Contiene Carbonato de sodio al 2% (Na_2CO_3), Tartrato sódico al 0.16%, NaOH al 0.4%, ácido Bicinconínico y Bicarbonato de sodio al 0.95% (NaHCO_3).

-Reactivo B: Contiene solo Sulfato cúprico al 4% (CuSO_4).

Para realizar este ensayo se necesitó el reactivo de trabajo (WR), este se preparó mezclando 50partes BCA reactivo A y 1parte del BCA reactivo B (50:1, Reactivo A:B) (Cantidad según protocolo). Para determinar el volumen total de WR necesario se usó la siguiente fórmula.

$$\text{Vol. total requerido del WR} = (\# \text{estándares} + \# \text{muestras}) \times (\# \text{duplicados}) \times (\text{vol. de WR por muestra})$$

$$\text{Vol. total requerido del WR} = (9 \text{estándares} + 2 \text{muestras}) \times (4) \times (0.2 \text{ml por muestra})$$

$$\text{Vol. total requerido del WR} = 8.8\text{ml}$$

Para obtener la proporcionalidad 50:1 del Reactivo A:B y poder preparar el WR, se hizo una regla de tres simple.

- BCA reactivo A, 50 partes:

$$\begin{array}{r} 8.8\text{ml} - - - - - 51 \\ X\text{ml} - - - - - 50 \\ X = 8.62\text{ml} \end{array}$$

- BCA reactivo B, 1 parte:

$$\begin{array}{r} 8.8\text{ml} - - - - - 51 \\ X\text{ml} - - - - - 1 \\ X = 0.173\text{ml} \end{array}$$

Finalmente, se coloca en un vial limpio y transparente los 8.62ml del BCA reactivo A y los 0.17ml del BCA reactivo B, el WR tomó una coloración verde clara.

2.2.4. Procedimiento en platos de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas

Para establecer la relación entre una cierta concentración de proteína y una cierta absorción, se preparó una serie de muestras estándares de proteína que tienen concentración conocida (según tabla II.1). Se adicionó 25µL de cada estándar, los estándares se hicieron por cuadruplicado, y a las 2 últimas columnas se adiciono 25µL de las muestras 1 y 2, las muestras se hicieron también por cuadruplicado; a cada pocillo se agregó 200µL del WR. Posteriormente, se llevó a la incubadora por 30 minutos y pasado el tiempo se esperó unos 5 minutos a que enfríe, en donde se lleva a cabo la reacción y se determinó, en un espectrofotómetro, la absorción de cada muestra.

2.3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB₁ EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G MEDIANTE WESTERN BLOT.

Para evaluar la presencia del receptor cannabinoide CB₁ en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se utilizó la técnica analítica de Western Blot.

FUNDAMENTO:

El western blot es un método en biología molecular, bioquímica, inmunogenética para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto. Implementa gel electroforesis para separar proteínas desnaturalizadas de la masa. Las proteínas son transferidas desde el gel hacia la membrana (originalmente de nitrocelulosa), donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Como resultado, los investigadores pueden examinar la cantidad de proteínas en una muestra y comparar los niveles de presencia entre varios grupos.

2.3.1. Cultivo de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

Se cogió uno de los frascos de incubación de generación 20 de pasaje, se desechó el medio que contenía el frasco de incubación con el anterior pasaje y se agregó 3ml de Tripsina-EDTA con una agitación ligera que luego se desecha. Después, se agregó otros 5ml de Tripsina-EDTA y este se incubó a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ por 12 minutos, moviéndola con una agitación ligera cada 4 minutos por 3 veces. Al finalizar el tiempo de incubación se agregó 10ml de medio DMEM sin FBS mezclando con el contenido del frasco de incubación. La suspensión se transfirió a un tubo para centrifuga de 50ml y se centrifugó a 1000rpm por 5 minutos. Después se obtuvo un pellet eliminando el medio sobrenadante y se volvió a resuspender con 10ml de medio DMEM enriquecido con 10% FBS. La suspensión final es la que se utilizó para realizar la técnica analítica de Western Blot.

2.3.2. Aislamiento de las proteínas de las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

Se colocó la suspensión de células (T98G) a un tubo eppendorf, luego se centrifugó las células durante 5 minutos a 1250rpm en 4°C. Al finalizar se desechó el sobrenadante, para obtener el peso de las células.

$$Peso_{células} = (Peso_{pellet} + Peso_{tubo\ eppendorf}) - Peso_{tubo\ eppendorf}$$

$$Muestra\ 3 \rightarrow 0.97644g - 0.9186 = 0.05784g$$

Al pellet se le adicionó 1ml (1000μL) de PBS 1X cold. Se resuspendió las células y nuevamente se llevó a la centrifugadora durante 5 minutos a 3000 rpm en 4°C. Al finalizar se desechó el sobrenadante y se adicionó 1000μL de PBS frío (este paso se realizó por dos veces). Después, se desechó el sobrenadante para adicionar lysis buffer RIPA con EDTA.

$$Muestra\ 3 \rightarrow Peso_{células} = 0.05784g + 100\mu LRIPA$$

Posteriormente se incubó las muestras en hielo por un periodo de 30 minutos, colocando cada 10 minutos por 3 veces en el vórtex. Finalmente, se centrifugó por 10 minutos a 1300 rpm en 4°C.

Para el conteo de células viables se sacó 20μL de la suspensión de células y esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf mezclando con 20μL de solución de azul de tripán, se agitó hasta lograr homogeneidad. De esta mezcla se colocó 20μL en una celda para conteo celular. La suspensión de Glioblastoma Multiforme Humano T98G contenía:

$$M_3 \Rightarrow 5.80 \times 10^6 \text{ células/ml con una viabilidad de } 95.1\%.$$

2.3.3. Determinación de la concentración de proteínas de la muestra 3

Para evaluar la concentración óptima de proteínas de la muestra 3 de la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA).

2.3.3.1. Preparación de estándares diluidas de albúmina (BSA): Las diluciones se prepararon por triplicado, exactamente con las cantidades indicadas con la ayuda de una micropipeta, se utilizó la Tabla II.4.

2.3.3.2. Preparación del reactivo de trabajo BCA (WR): Este se preparó mezclando 50 partes BCA reactivo A y 1 parte del BCA reactivo B (50:1, Reactivo A:B) (Cantidad según protocolo).

$$\begin{aligned} \text{Vol. total requerido del WR} \\ &= (\# \text{estándares} + \# \text{muestras}) \times (\# \text{duplicados}) \\ &\quad \times (\text{vol. de WR por muestra}) \end{aligned}$$

$$\text{Vol. total requerido del WR} = (9 + 1) \times (3) \times (0.2) = 5.4 \text{ ml}$$

- BCA reactivo A, 50 partes:

$$\begin{aligned} 5.4 \text{ ml} & \text{-----} 51 \\ X \text{ ml} & \text{-----} 50 \\ X &= 5.29 \text{ ml} \end{aligned}$$

- BCA reactivo B, 1 parte:

$$\begin{aligned} 5.4 \text{ ml} & \text{-----} 51 \\ X \text{ ml} & \text{-----} 1 \\ X &= 0.105 \text{ ml} \end{aligned}$$

Finalmente, se coloca en un vial limpio y transparente los 5.29 ml del BCA reactivo A y los 0.11 ml del BCA reactivo B, el WR tomó una coloración verde clara.

2.3.3.3. Procedimiento en plato de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas: Se adicionó 25 μ L de cada estándar, los estándares se hicieron por triplicado, y a la última columna se adiciono 25 μ L de la muestra 3, la muestra se realizó también por triplicado; a cada pocillo se agregó 200 μ L del WR. Posteriormente, se llevó a la incubadora por 30 minutos y pasado el tiempo se esperó unos 5 minutos a que enfríe, en donde se lleva a cabo la

reacción y se determinó, en un espectrofotómetro, la absorción de cada muestra.

2.3.3.4. Lectura del Espectrofotómetro: Se insertó el plato de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas, salieron los valores de absorbancia y con ello se realizó una gráfica de la relación entre proteína concentración $\mu\text{g/ml}$ y absorbancia a 562nm (Figura II.10). Se utilizó el promedio de los tres valores encontrados para cada concentración de la muestra 3.

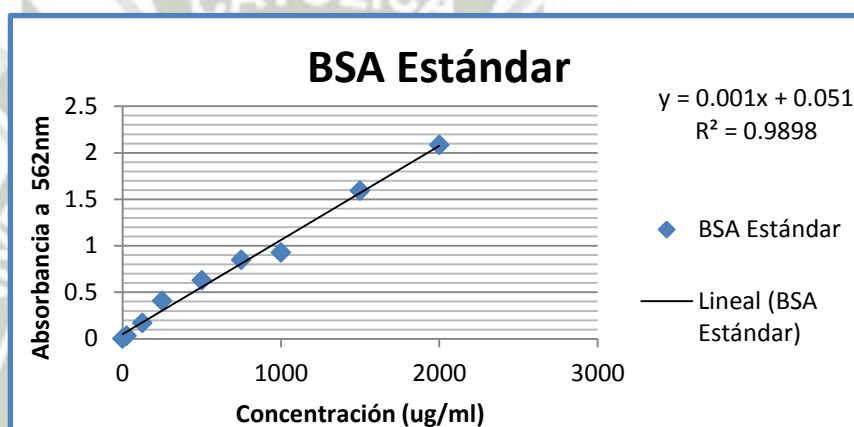


Figura II.10. Curva estándar de BSA por el método del ácido Bicinónico (BCA).

Fuente: Elaboración propia.

$$Y = 0.001X + 0.051$$

$$\text{Promedio} - \text{Blanco} = 1.357667 - 0.108333 = 1.249333$$

$$1.249333 = 0.001X + 0.051$$

$$X = 1198.333\mu\text{g}$$

La gráfica de la Figura II.10, demostró linealidad y esto corroboró que la ecuación de la curva estándar de BSA proporciona la confiabilidad de los resultados en esta investigación.

- Cálculo de la cantidad de muestra necesario:

$$\frac{1198.333\mu g}{1ml} = \frac{1198.333\mu g}{1000\mu L} = \frac{100\mu g}{X\mu L} = 83.44924\mu L = 83.4\mu L$$

- Cálculo de la cantidad de RIPA necesario:

$$100\mu L - 83.4\mu L = 16.6\mu L$$

- Para preparar Laemmli's SDS-Sample buffer (4X reducing):

$$100\mu L RIPA + 100\mu L SDS 4X = 200\mu L Dye (2X) \text{ (Figura II.11)}$$

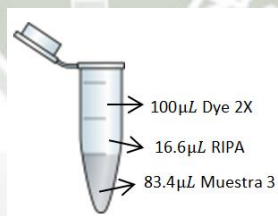


Figura II.11. Representación gráfica de la muestra 3.

Fuente: Elaboración propia.

La muestra 3 (83.4µL de muestra 3 + 16.6µL RIPA + 100µL Dye (2X)) se guardó en el refrigerador.

2.3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. "SDS-PAGE" (PAGE = polyacryl amide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS).

⇒ Se preparó el gel SDS-PAGE (Figura II.12) que separa las proteínas en función de su peso molecular.

1. Para la preparación del gel separador o inferior (5 ml, grosor = 0,75 mm), se mezcló los siguientes reactivos, según la Tabla II.2, en un frasco Kitasato de 50 ml:

Tabla II.2. Preparación del gel separador o inferior.

Componente	Concentración final 20%
Agua desionizada	367 μ l
Amortiguador separador	1250 μ l
SDS	50 μ l
Acrilamida/bisacrilamida	3333 μ l

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

2. Se armó el molde para el gel, se montó el “sandwich” con dos placas de vidrio (uno tiene un rebaje) y los dos “separadores” en vertical entre ellas y a ambos lados. Se introdujo en el soporte formador de geles y se adicionó la preparación del gel separador.
3. Se inició la reacción de polimerización agregando 3ml de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina) y 15ml de persulfato de amónico a la mezcla. Inmediatamente se mezcló y se vertió la solución en los vidrios (molde), hasta la marca hecha, sin atrapar burbujas. De seguido, se eliminó la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada (esto hace que la superficie del gel quede recta), depositada muy suavemente sobre la mezcla. Se dejó que polimerice el gel óptimamente en 20 min.
4. Una vez que la interfase entró el polímero y el agua se tornó visible, se esperó 15 min adicionales para que se complete la reacción. Luego, se decantó el exceso de líquido (agua destilada) de la superficie, y antes de que polimerice se introdujo en la parte superior el “peine”, que formará en el gel acumulador los pocillos para luego poder aplicar las muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas).
5. Se preparó el gel superior o compactador, mezclando los componentes según la Tabla II.3:

Tabla II.3. Preparación del gel superior o compactador.

Componente	Cantidad
Agua desionizada	1,5 ml
Amortiguador superior	630 μ l
SDS	33 μ l
Acrilamida/bisacrilamida	330 μ l
TEMED	2 μ l
Persulfato de amonio	10 μ l

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

6. Una vez agregados los catalizadores, se mezcló y vertió de inmediato en el molde, nivelando ahora el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Se dejó polimerizar.
7. Finalmente se quitó el peine deslizándolo suavemente, y se lavó los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa (esto elimina residuos de componentes no polimerizados).

⇒ Se cogió la muestra 3 preparada de Laemmli's SDS-Sample (83.4 μ L de muestra 3+16.6 μ L RIPA + 100 μ L Dye (2X)) que estuvo guardada en el refrigerador, para calentarla a 100°C por 5 minutos.

⇒ Una vez armado el equipo, se colocó sobre un recipiente al cual se le adicionó lentamente Running buffer (10X Tris-Glycine SDS buffer) según la Tabla II.4, 100ml de buffer + 900ml de agua destilada.

Tabla II.4. Preparación del Running buffer.

Componente	Cantidad
Tris base	25 mM
Glycine	190 mM
SDS	0.1%

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

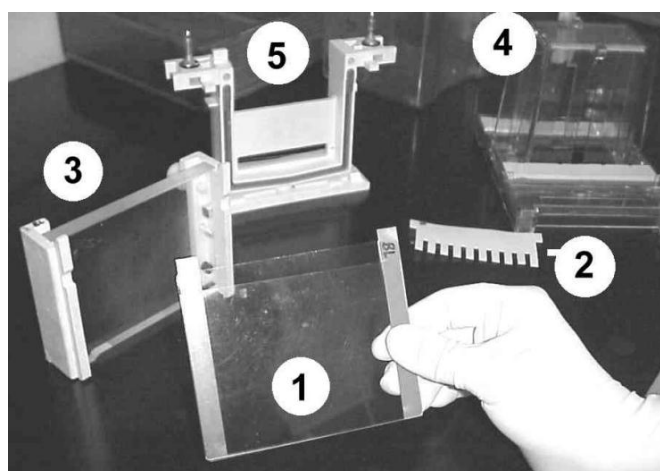


Figura II.12. Preparación de un gel de poliacrilamida.

(1) Vidrios, que determinan el grosor del gel; (2) Peine, para formar los hoyos para muestras; (3) Bloque de plástico para ensamblar los vidrios; (4) Base para realizar el chorreo del gel; (5) Núcleo de la cámara de electroforesis, con los electrodos.

⇒ Se cargó las muestras en los hoyos (5-40 μ L por duplicado) (Tabla II.5), al primer hoyo se adicionó ab116027 Prism Ultra protein Ladder (10-180kDa) Abcam® (Molecular weight ladder), fue fundamental realizar estos pasos sin que haya contaminaciones cruzadas entre los distintos hoyos, por ello se usó diferentes puntas desechables para micropipeta.

Tabla II.5. Cantidad y ubicación de la muestra³ en los hoyos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 μ L Prism Ultra protein Ladder 10-180KDa	5 μ L M ₃	5 μ L M ₃	10 μ L M ₃	10 μ L M ₃	20 μ L M ₃	20 μ L M ₃	40 μ L M ₃	40 μ L M ₃

Fuente: Elaboración propia.

⇒ Se colocó la cubierta del instrumento (Figura II.13) en la orientación indicada basado en electrodos, se insertó los electrodos en el tomacorriente, se adiciono el resto del Running buffer y se colocó a 125V durante 1 hora y media; primero se comenzó con 80V y después de 30 minutos se aumentó a 125V.

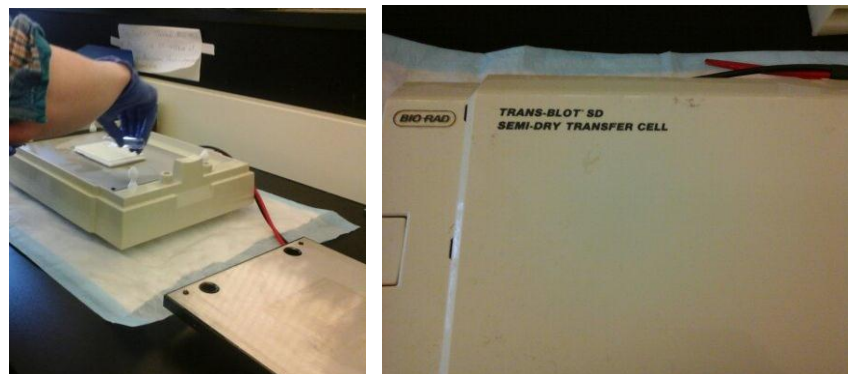


Figura II.13. Equipo Trans-Blot SD, SEMI-DRY TRANSFER CELL.

2.3.5. Transferencia del gel de poliacrilamida con SDS. "SDS-PAGE" a una membrana de nitrocelulosa.

- ⇒ Pasada la hora y media, se desconectó la corriente y se sacó el sándwich, se separaron las placas de vidrio con ayuda de una espátula y se sacó el gel (se usó guantes para evitar tocar el gel con los dedos) con cuidado de no invertir su orientación.
- ⇒ Se cortó 2 pedazos de filtros y 2 membranas de nitrocelulosa (a tamaño de 2.5cm * 3.5cm), las que fueron remojadas en Transfer buffer (Tabla II.6) en un recipiente de plástico.

Tabla II.6. Preparación del Transfer buffer.

Componente	Cantidad
Tris base	25 mM
Glycine	190 mM
Metanol	20%

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

- ⇒ Luego se colocó los filtros y las membranas de nitrocelulosa (Figura II.14), nuevamente en el equipo (asegurando de que no haya burbujas entre cada capa, haciendo rodar un tubo de ensayo en la parte superior de este sándwich evitando presionar demasiado fuerte para evitar que se rompa el gel de poliacrilamida con SDS).



Figura II.14. Filtros y membranas de nitrocelulosa (a tamaño de 2.5cm * 3.5cm), remojadas en Transfer buffer en un recipiente de plástico.

- ⇒ Se colocó la cubierta del instrumento, se insertó los electrodos en el tomacorriente, se adiciono el resto del Transfer buffer y se colocó a 14V durante 45 minutos.
- ⇒ Al finalizar el tiempo se retiró el gel del cassette (con una espátula para acabar de abrir el cassette), se cortó los bordes de los geles de poliacrilamida con SDS a la altura de las membranas de nitrocelulosa (para eliminar el exceso de gel de poliacrilamida con SDS) y se colocó en un nuevo pocillo de plástico con agua destilada.

2.3.6. Bloqueo de membrana de nitrocelulosa.

- ⇒ Se colocó el pocillo de plástico con agua destilada sobre un rotador durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ⇒ Se prepare el Washing buffer (TBST): Tris-buffered saline Tween (Tabla II.7).

Tabla II.7. Preparación del Washing buffer (TBST).

Componente	Cantidad
TBS 10X (Tris-buffered saline 10X, pH 7.4)	100 ml
Agua destilada	900 ml
Tween 20	500µL

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

⇒ Se preparó el Blocking buffer (Milk buffer) 5% de leche en polvo con 1X de Washing buffer (TBST) , según la Tabla II.8

Tabla II.8. Preparación del Blocking buffer.

Componente	Cantidad
Leche en polvo	5.0000g
Washing buffer (TBST)	100 ml

Fuente: Western Blot procedure Abcam®.

⇒ Para bloquear la membrana de nitrocelulosa, se adicionó el Blocking buffer durante 1 hora en un rotador a temperatura ambiente.

⇒ Finalizado el tiempo se lavó la membrana de nitrocelulosa con Washing buffer (TBST) durante 5 minutos en un rotador (Figura II.15) a temperatura ambiente por 3 veces.



Figura II.15. Equipo Rocking Platform (Rotador de Temperatura Ambiente).

2.3.7. Anticuerpo Primario.

⇒ Se añadió el 1° anticuerpo primario a la membrana (1° Ab), se usó el Ab23703 anticuerpo anti-receptor de cannabinoides 1 (60kDa) Abcam®.

⇒ Se realizó la dilución del anticuerpo primario con BSA (albúmina de suero bovino) en un tubo de centrifuga Falcon 50 ml (la dilución 1: 200 fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante Abcam®).

- ⇒ Se lavó la membrana de nitrocelulosa con la dilución y se incubó en el rotador a 4°C durante toda la noche.
- ⇒ Al día siguiente, se lavó la membrana de nitrocelulosa con Washing buffer (TBST) durante 5 minutos en un rotador a temperatura ambiente por 3 veces.
- ⇒ En un vial se preparó 20μL del anticuerpo anti-receptor de cannabinoides 1 con 4000μL de TBS 1X, la solución se adiciono sobre la membrana de nitrocelulosa y se colocó en el rotador 4°C durante toda la noche.

2.3.8. Anticuerpo Secundario.

- ⇒ Se añadió el 2° anticuerpo secundario a la membrana (2° Ab), se usó el Ab97069Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (67kDa) Abcam®.
- ⇒ Se lavó la membrana de nitrocelulosa durante 10 minutos en el rotador a temperatura ambiente por 3 veces (para eliminar residuos del anticuerpo primario y evitar la aparición de bandas no específicas).
- ⇒ Mientras se lavaba, se realizó la dilución del anticuerpo secundario con Washing buffer (TBST) en un tubo de centrifuga Falcon 50 ml (la dilución 1: 10000 fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante Abcam®).
- ⇒ Se incubó la membrana de nitrocelulosa con la dilución en el rotador a temperatura ambiente por 1 hora.
- ⇒ Se lavó la membrana de nitrocelulosa con Washing buffer (TBST) durante 10 minutos en un rotador a temperatura ambiente por 3 veces.
- ⇒ En un vial se preparó 1μL del 2° anticuerpo secundario con 10000μL de TBS 1X, la solución se adiciono sobre la membrana de nitrocelulosa y se incubó por 1 hora en el rotador.
- ⇒ Pasada la hora se lavó la membrana de nitrocelulosa con Washing buffer (TBST) durante 5 minutos en un rotador a temperatura ambiente por 3 veces.

2.3.9. Anticuerpo Anti-Actina.

- ⇒ Se añadió el Anticuerpo Anti-Actina, se usó el Ab49900 Anti-beta Actin antibody [AC-15] (HRP) (42kDa) Abcam®.
- ⇒ Se lavó la membrana de nitrocelulosa durante 10 minutos en el rotador a temperatura ambiente por 3 veces.
- ⇒ Mientras se lavaba, se realizó la dilución del Anticuerpo Anti-Actina con Milk buffer al 1% en un tubo de centrífuga Falcon 50 ml (la dilución 1: 20000 fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante Abcam®).
- ⇒ Se incubó la membrana de nitrocelulosa con la dilución en el rotador a temperatura ambiente por 1 hora.
- ⇒ Se lavó la membrana de nitrocelulosa con Washing buffer (TBST) durante 5 minutos en un rotador a temperatura ambiente por 3 veces.

2.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CANNABINOIDES

2.4.1. Preparación de la solución de Anandamida (AEA, PM 347,53 g/mol)

La anandamida viene en presentación líquida como 5mg/ml. Para la preparación de la muestra, se retiró 1 ml con la ayuda de una jeringa del vial de anandamida que fue adquirida por Abcam® para obtener una solución stock de 4800µM. Los vehículos usados fueron 10% de DMSO y 90% de PBS.

$$\frac{5mgAEA}{347.53mg/mmol} \times \frac{1}{0.003L} = 4.80mM \cong 4800 \mu M \text{ (3000 } \mu L \text{ stock)}$$

- ⇒ Se obtuvo la concentración de 4800µM.
- ⇒ 0.003L es 2ml de DMSO +1ml de solución de AEA.

A partir de esta solución stock 4800µM se preparó soluciones para ensayos posteriores. Cuyas concentraciones fueron de 5, 30 y 100µM. La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$4800\mu\text{M} \times V_1(\text{ml de sol.}) = C_2(\text{conc final en } \mu\text{M}) \times 10\text{ml}$$

- Concentración en viales: 5, 30, 100 μM
 - Concentración en pozo: 0.5, 3, 10 μM
- $\times 10$

Se consideró la proporción de 10% de DMSO y 90% de PBS, por lo tanto se agregó la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para cumplir este requisito.

a. Preparación de la dilución de 5 μM ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4800\mu\text{M} \times V_1 = 5\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.0104\text{ml} \cong 10.4\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = 1000 μL – 10.4 μL = 989.6 μLDMSO
- PBS = 10ml – 1ml = 9mlPBS

b. Preparación de la dilución de 30 μM ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4800\mu\text{M} \times V_1 = 30\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.0625\text{ml} \cong 62.5\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = 1000 μL – 62.5 μL = 937.5 μLDMSO
- PBS = 10ml – 1ml = 9mlPBS

c. Preparación de la dilución de 100 μM ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4800\mu\text{M} \times V_1 = 100\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.208\text{ml} \cong 208\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = 1000 μL – 208 μL = 792 μLDMSO
- PBS = 10ml – 1ml = 9mlPBS

En la Tabla II.9, se muestra la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para preparar la solución del endocannabinoide (anandamida).

Tabla II.9. Soluciones de anandamida.

Conc. final (μM)	μL de Sol stock($4800\mu\text{M}$)	μL de DMSO	ml de PBS
5	10.4	989.6	9
30	62.5	937.5	9
100	208	792	9

Fuente: Elaboración propia.

2.4.2. Preparación de la solución de WIN55,212-2 mesylate (WIN, PM 522.61g/mol)

El WIN55,212-2 mesylate viene en presentación sólida en forma de polvo con un contenido de 25mg.

Para la preparación de la muestra se tomó 5mg de WIN para obtener una solución stock de $4783\mu\text{M}$. Los vehículos usados fueron 10% de DMSO y 90% de PBS.

$$\frac{5\text{mg WIN}}{522.61\text{mg/mmole}} \times \frac{1}{0.002\text{L de DMSO}} = 4.783\text{mM} \cong 4783\mu\text{M} \text{ (2000 } \mu\text{L stock)}$$

⇒ Se obtuvo la concentración de $4783\mu\text{M}$.

⇒ 0.002L es 100% puro de DMSO.

A partir de esta solución stock $4783\mu\text{M}$ se preparó soluciones para ensayos posteriores. Cuyas concentraciones fueron de 25, 50 y $100\mu\text{M}$. La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$4783\mu\text{M} \times V_1(\text{ml de sol.}) = C_2(\text{conc final en } \mu\text{M}) \times 10\text{ml}$$

- Concentración en viales: 25, 50, $100\mu\text{M}$
 - Concentración en pozo: 2.5, 5, $10\mu\text{M}$
- ↪ $\times 10$

Se consideró la proporción de 10% de DMSO y 90% de PBS, por lo tanto se agregó la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para cumplir este requisito.

a. Preparación de la dilución de 25 μ M ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4783\mu\text{M} \times V_1 = 25\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.0523\text{ml} \cong 52.3\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = $1000\mu\text{L} - 52.3\mu\text{L} = 947.7\mu\text{LDMSO}$
- PBS = $10\text{ml} - 1\text{ml} = 9\text{mlPBS}$

b. Preparación de la dilución de 50 μ M ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4783\mu\text{M} \times V_1 = 50\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.104\text{ml} \cong 104\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = $1000\mu\text{L} - 104\mu\text{L} = 896\mu\text{LDMSO}$
- PBS = $10\text{ml} - 1\text{ml} = 9\text{mlPBS}$

c. Preparación de la dilución de 100 μ M ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$4783\mu\text{M} \times V_1 = 100\mu\text{M} \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = 0.209\text{ml} \cong 209\mu\text{L del stock}$$

- DMSO = $1000\mu\text{L} - 209\mu\text{L} = 791\mu\text{LDMSO}$
- PBS = $10\text{ml} - 1\text{ml} = 9\text{mlPBS}$

Tabla II.10. Soluciones de WIN55,212-2 mesylate.

Conc. final (μM)	μL de Sol stock (4783 μM)	μL de DMSO	ml de PBS
25	52.3	947.7	9
50	104	896	9
100	209	791	9

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.10, se muestra la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para preparar la solución del cannabinoide (WIN55,212-2 mesylate).

2.5.PREPARACIÓN DE LA DROGA UTILIZADA

2.5.1. Preparación de la solución de temozolamida (TMZ, PM 194.15g/mol)

La temozolamida viene en presentación sólida en forma de polvo con un contenido de 25mg. Para la preparación de la muestra se tomó 5mg de TMZ para obtener una solución stock de 5150 μ M. Los vehículos usados fueron 50% de DMSO y 50% de PBS.

$$\frac{5mgTMZ}{194.15mg/mmol} \times \frac{1}{0.005L \text{ de } 50\% \text{ DMSO}} = 5.15mM$$

$$\cong 5150\mu M \text{ (5000 } \mu L \text{ stock)}$$

- ⇒ Se obtuvo la concentración de 5150 μ M.
- ⇒ 0.005L es 50% de DMSO en PBS.
- ⇒ Primero se adiciona 50% de DMSO y después 50% de PBS.
- ⇒ En lugar de PBS se puede usar PEG como vehículo de disolución.
- ⇒ 5150 μ M stock = 5mgTMZ + 2.5ml DMSO + 2.5ml PBS.

A partir de esta solución stock 5150 μ M se preparó soluciones para ensayos posteriores. Cuyas concentraciones fueron de 250, 500 y 1000 μ M. La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$5150\mu M \times V_1(ml \text{ de sol.}) = C_2(conc \text{ final en } \mu M) \times 5ml$$

- Concentración en viales: 250, 500, 1000 μ M
 - Concentración en pozo: 25, 50, 100 μ M
- ↪ $\times 10$

Se consideró la proporción de 50% de DMSO y 50% de PBS, por lo tanto se agregó la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para cumplir este requisito.

a. Preparación de la dilución de 250 μ M ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$5150\mu M \times V_1 = 250\mu M \times 5ml$$

$$V_1 = 0.243ml \cong 243\mu L \text{ del stock}$$

(contiene 121.5 μ L DMSO + 121.5 μ L PBS)

- $\text{DMSO} = 500\mu\text{L} - 121.5\mu\text{L} = 378.5\mu\text{L DMSO}$
- $\text{PBS} = 4500\mu\text{L} - 121.5\mu\text{L} = 4378.5\mu\text{L PBS}$

b. Preparación de la dilución de 500 μM ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$5150\mu\text{M} \times V_1 = 500\mu\text{M} \times 5\text{ml}$$

$$V_1 = 0.485\text{ml} \cong 485\mu\text{L del stock}$$

(contiene 242.5 μL DMSO + 242.5 μL PBS)

- $\text{DMSO} = 500\mu\text{L} - 242.5\mu\text{L} = 257.5\mu\text{L DMSO}$
- $\text{PBS} = 4500\mu\text{L} - 242.5\mu\text{L} = 4257.5\mu\text{L PBS}$

c. Preparación de la dilución de 1000 μM ($C_1V_1 = C_2V_2$)

$$5150\mu\text{M} \times V_1 = 1000\mu\text{M} \times 5\text{ml}$$

$$V_1 = 0.971\text{ml} \cong 971\mu\text{L del stock}$$

(contiene 485.5 μL DMSO + 485.5 μL PBS)

- $\text{DMSO} = 500\mu\text{L} - 485.5\mu\text{L} = 15.5\mu\text{L DMSO}$
- $\text{PBS} = 4500\mu\text{L} - 485.5\mu\text{L} = 4014.5\mu\text{L PBS}$

En la Tabla II.11, se muestra la cantidad necesaria según cálculos de DMSO y PBS para preparar la solución de la droga (temozolamida).

Tabla II.11. Soluciones de temozolamida.

Conc. final (μM)	μL de Sol stock(5150 μM)	μL de DMSO	μL de PBS
250	243	378.5	4378.5
500	485	257.5	4257.5
1000	971	15.5	4014.5

Fuente: Elaboración propia.

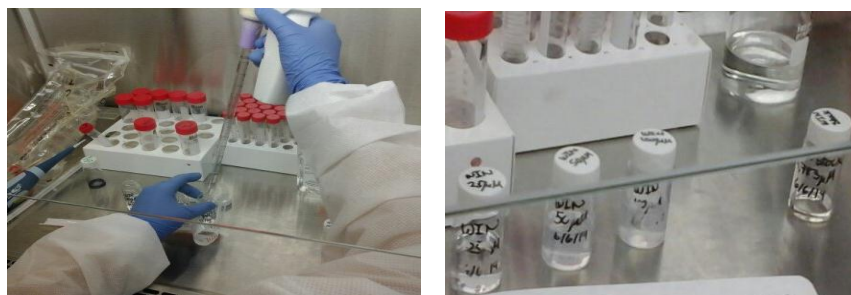


Figura II.16. Preparación de las drogas utilizadas.

2.6. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS.

Se aplicó el ensayo de MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium]), este es un método colorimétrico, que determina la viabilidad celular de células, citotoxicidad o quimio sensibilidad de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Este ensayo contiene un reactivo derivado de tetrazolium, que reacciona con las enzimas mitocondriales (enzima deshidrogenasa) formando un compuesto formazan (Figura II.17), el cual es cromóforo, absorbiendo luz a una longitud de onda de 490nm (azul). La viabilidad celular es directamente proporcional al color producido por el ensayo de MTS.

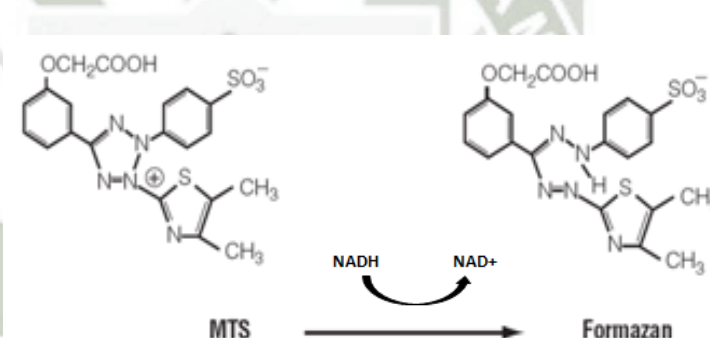


Figura II.17. Reacción del ensayo MTS.

Fuente: Elaboración propia.

Para demostrar el synergismo y la citotoxicidad de los CB, eCB con la TMZ sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G, se realizó un tratamiento individual al CB, eCB y a la droga usada en esta investigación; también se realizó un tratamiento combinado en dos etapas.

- 1^{ra} Etapa: PRE-Tratamiento; donde se administró primero el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate) y después se administró la droga (TMZ).
- 2^{da} Etapa: POST-Tratamiento; donde se administró primero la droga (TMZ) y después se administró el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate).

Las concentraciones trabajadas fueron:

- AEA: Anandamida, endocannabinoide natural (eCB). AEA 0.5, 3 y 10 μ M.
- WIN: WIN55,212-2 mesylate, cannabinoide sintético (CB). WIN 2.5, 5 y 10 μ M.
- TMZ: Temozolamida, agente citostático (DROGA). TMZ 25, 50 y 100 μ M.

Todos ellos realizados a tres diferentes tiempos: 12 hrs, 24 hrs y 48 hrs.

2.6.1. Tratamiento individual con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

Se realizó dos conteos celulares viables de 245 000 $\frac{\text{células}}{\text{ml}}$ y de 200 000 $\frac{\text{células}}{\text{ml}}$ (células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G).

$$\chi = \frac{2.45 \times 10^5 + 2.00 \times 10^5}{2} = 2.255 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1.0 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pozo}}}{2.255 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}} = 0.0449 \frac{\text{ml}}{\text{pozo}} = 44.94 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$$

⇒ La cantidad máxima es de 220 μ L por pozo, se incubó 44.94 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$ de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas por triplicado.

⇒ Luego se añadió 135.1 μ L del medio DMEM sin FBS (medio MDEM blanco) a 37°C y de 5% de CO₂ (180 μ L-44.9 μ L=135.1 μ L).

⇒ Se adicionó 20 μ L de AEA a (0.5, 3 y 10 μ M), WIN a (2.5, 5 y 10 μ M) y TMZ a (25, 50 y 100 μ M), las muestras se realizaron por triplicado.

⇒ Se realizó 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, uno para un periodo de incubación de 12 horas, el segundo para un periodo de incubación de 24 horas y el tercero para un periodo de incubación de 48 horas (Figura II.18).

- ⇒ Además se realizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó un blanco con solo DMSO 10% para evaluar si se encontraba puro, para evitar una falsa respuesta por una posible contaminación (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS, con el fin de corroborar que la solución se encontraba en óptimas condiciones (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Pasado el tiempo de incubación de cada plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas (12, 24 y 48 horas), se agregó 10µl de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Tabla II.12. Esquema de cantidades usadas para los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONTROL	TEMOZOLOMIDA			ANANDAMIDA			WIN 55, 212-2 mesylate			BLANCO	BLANCO
Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 10% DMSO (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 25 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 50 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 0.5 µM AEA (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 3 µM AEA (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 10 µM AEA (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 2.5 µM WIN (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 5 µM WIN (20µl) + MTS (10µl)	Células (44.94 µl) + Medio (135.1 µl) + 10 µM WIN (20µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (210µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (210µl) + 10% DMSO (10µl)

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.12, se muestra el esquema de las cantidades y concentraciones usadas para los para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas) en los platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

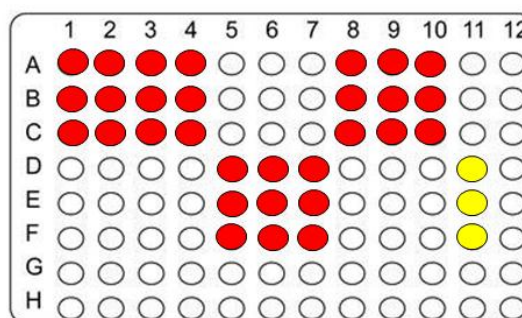


Figura II.18. Esquema del plato transparente de 96 pozos.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura II.18, se esquematiza del A1 a C1 el CONTROL; de 2A a 2C temozolamida 25 μ M; de 3A a 3C temozolamida 50 μ M, de 4A a 4C temozolamida 100 μ M; de 5D a 5F Anandamida 0.5 μ M; de 6D a 6F Anandamida 3 μ M; de 7D a 7F anandamida 10 μ M; de 8A a 8C WIN55,212-2 mesylate 2.5 μ M; de 9A a 9C WIN55,212-2 mesylate 5.0 μ M; de 10A a 10C WIN55,212-2 mesylate 10 μ M; de 11D a 11F BLANCO de DMSO 10% y solución de MTS; de 12D a 12F BLANCO de DMSO 10%. Es el mismo esquema para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

2.6.2. Tratamiento combinado con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

2.6.2.1. 1^{ra} Etapa: PRE-Tratamiento; donde se administró primero el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate) y después se administró la droga (TMZ).

2.6.2.1.1. PRE-Tratamiento de anandamida más temozolamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Se realizó conteo celular manual:

- 1^{er} conteo: 35
- 2^{do} conteo: 40
- 3^{er} conteo: 24
- 4^{to} conteo: 22

El promedio fue $\Rightarrow \bar{X} 1$.

$$\frac{31}{4} = 7.75 \times 2 = 15.5 \times 10^4 = 155000 = 1.55 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1.0 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pozo}}}{1.55 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}} = 0.0645 \frac{\text{ml}}{\text{pozo}} = 64.6 \frac{\mu\text{l}}{\text{pozo}}$$

- ⇒ La cantidad máxima es de 220μL por pozo, se incubó 64.6 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$ de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas por triplicado.
- ⇒ Luego se añadió 115.4μl del medio DMEM sin FBS (medio MDEM blanco) a 37°C y de 5% de CO₂ (180μl-64.6μl=115.4μl).
- ⇒ Se adicionó 20μl de AEA de (5, 30 y 100μM), (el ensayo se realizó por triplicado), se incubó por 12, 24 y 48 horas.
- ⇒ Después de la incubación de cada periodo del eCB, se adicionó 20μl de TMZ de (275, 550 y 1100 μM), por 12 horas de incubación.
- ⇒ Se realizó 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, uno para un periodo de incubación de 12 horas, el segundo para un periodo de incubación de 24 horas y el tercero para un periodo de incubación de 48 horas (Figura II.19).
- ⇒ Además se realizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó un blanco con solo DMSO 10% para evaluar si se encontraba puro, para evitar una falsa respuesta por una posible contaminación (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS, con el fin de corroborar que la solución se encontraba en óptimas condiciones (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Pasada las 12 horas de incubación de cada plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas (12, 24 y 48 horas), se agregó 10μl de solución

de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Tabla II.13. Esquema de cantidades usadas para el PRE-Tratamiento de anandamida con temozolamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONTROL	Anandamida 0.5µM			Anandamida 3µM			Anandamida 10µM			BLANCO	BLANCO
	AEA	AEA	AEA	AEA	AEA	AEA	AEA	AEA	AEA		
	0.5µM	0.5µM	0.5µM	3µM	3µM	3µM	10µM	10µM	10µM		
	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ		
	25µM	50µM	100µM	25µM	50µM	100µM	25µM	50µM	100µM		
Células (64.6µl) + Medio (115.4µl) + 10% DMSO (20µl) + 10% DMSO (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 5µM AEA (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 5µM AEA (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 5µM AEA (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 30µM AEA (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 30µM AEA (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 30µM AEA (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 100µM AEA (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 100µM AEA (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (64.6 µl) + Medio (115.4 µl) + 100µM AEA (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (200µl) + 10% DMSO (20µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (200µl) + 10% DMSO (20µl) + 10% DMSO (10µl)

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.13, se muestra el esquema del PRE-Tratamiento de anandamida con temozolamida en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas para los 3 periodos de incubación. Las concentraciones que se muestra en la tabla en las dos primeras filas se refieren a las concentraciones en los pocillos, mientras que las concentraciones que se indican en las columnas detalladas se refieren a las concentraciones en los viales que se utilizó.

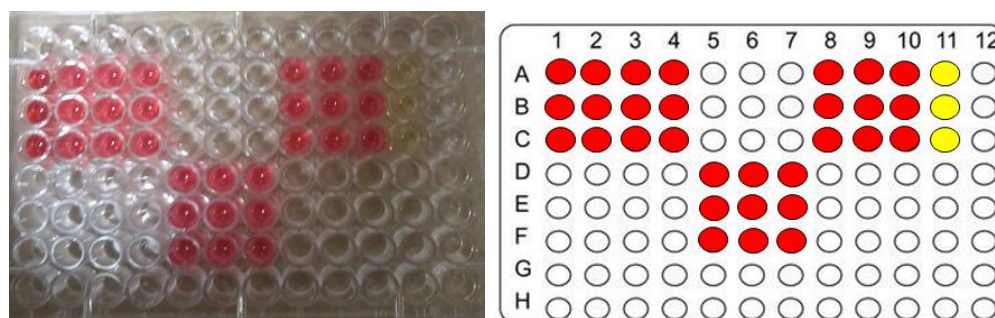


Figura II.19. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra, para el PRE-Tratamiento de anandamida con temozolamida.

Fuente: Elaboración propia (derecha).

En la Figura II.19, se esquematiza del A1 a C1 el CONTROL; de 2A a 2C AEA 5 μ M y TMZ 275 μ M; de 3A a 3C AEA 5 μ M y TMZ 550 μ M; de 4A a 4C AEA 5 μ M y TMZ 1100 μ M; de 5D a 5F AEA 30 μ M y TMZ 275 μ M; de 6D a 6F AEA 30 μ M y TMZ 550 μ M; de 7D a 7F AEA 30 μ M y TMZ 1100 μ M; de 8A a 8C AEA 100 μ M y TMZ 275 μ M; de 9A a 9C AEA 100 μ M y TMZ 550 μ M; de 10A a 10C AEA 100 μ M y TMZ 1100 μ M; de 11A a 11C BLANCO de DMSO 10% y solución de MTS; de 12A a 12C BLANCO de DMSO 10%. Es el mismo esquema para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

2.6.2.1.2. PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate más temozolamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Se realizó conteo celular manual:

- 1^{er} conteo: 61
- 2^{do} conteo: 61
- 3^{er} conteo: 51
- 4^{to} conteo: 51

El promedio fue $\Rightarrow \bar{X}=56$.

$$\frac{56}{4} = 14 \times 2 = 28 \times 10^4 = 280000 = 2.8 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1.0 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pozo}}}{2.8 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}} = 0.0357 \frac{\text{ml}}{\text{pozo}} = 35.8 \frac{\mu\text{l}}{\text{pozo}}$$

- ⇒ La cantidad máxima es de 220 μL por pozo, se incubó 35.8 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$ de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas por triplicado.
- ⇒ Luego se añadió 144.2 μl del medio DMEM sin FBS (medio MDEM blanco) a 37°C y de 5% de CO_2 (180 μl -35.8 μl =144.2 μl).
- ⇒ Se adicionó 20 μl de WIN de (25, 50 y 100 μM), (el ensayo se realizó por triplicado), se incubó por 12, 24 y 48 horas.
- ⇒ Después de la incubación de cada periodo del CB, se adicionó 20 μl de TMZ de (275, 550 y 1100 μM), por 12 horas de incubación.
- ⇒ Se realizó 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, uno para un periodo de incubación de 12 horas, el segundo para un periodo de incubación de 24 horas y el tercero para un periodo de incubación de 48 horas (Figura II.20).
- ⇒ Además se realizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó un blanco con solo DMSO 10% para evaluar si se encontraba puro, para evitar una falsa respuesta por una posible contaminación (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS, con el fin de corroborar que la solución se encontraba en óptimas condiciones (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Pasada las 12 horas de incubación de cada plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas (12, 24 y 48 horas), se agregó 10 μl de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Tabla II.14. Esquema de cantidades usadas para el PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate con temozolamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONTROL	WIN55,212-2 mesylate 2.5µM			WIN55,212-2 mesylate 5µM			WIN55,212-2 mesylate 10µM			BLANCO	BLANCO
	WIN 2.5µM TMZ 25µM	WIN 2.5µM TMZ 50µM	WIN 2.5µM TMZ 100µM	WIN 5µM TMZ 25µM	WIN 5µM TMZ 50µM	WIN 5µM TMZ 100µM	WIN 10µM TMZ 25µM	WIN 10µM TMZ 50µM	WIN 10µM TMZ 100µM		
Células (35.8µl) + Medio (144.2µl) + 10% DMSO (20µl) + 10% DMSO (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 25µM WIN (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 25µM WIN (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 25µM WIN (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 50µM WIN (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 50µM WIN (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 50µM WIN (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 100µM WIN (20µl) + 275 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 100µM WIN (20µl) + 550 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	Células (35.8 µl) + Medio (144.2 µl) + 100µM WIN (20µl) + 1100 µM TMZ (20µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (200µl) + 10% DMSO (20µl) + MTS (10µl)	10% DMSO (200µl) + 10% DMSO (20µl) + 10% DMSO (10µl)

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.14, se muestra el esquema del PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate con temozolamida en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas para los 3 periodos de incubación. Las concentraciones que se muestra en la tabla en las dos primeras filas se refieren a las concentraciones en los pocillos, mientras que las concentraciones que se indican en las columnas detalladas se refieren a las concentraciones en los viales que se utilizó.

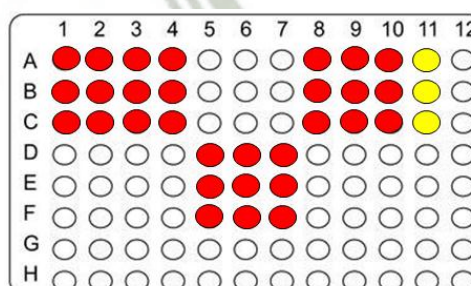


Figura II.20. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra para el PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate con temozolamida.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura II.20, se esquematiza del A1 a C1 el CONTROL; de 2A a 2C WIN 25 μ M y TMZ 275 μ M; de 3A a 3C WIN 25 μ M y TMZ 550 μ M; de 4A a 4C WIN 25 μ M y TMZ 1100 μ M; de 5D a 5F WIN 50 μ M y TMZ 275 μ M; de 6D a 6F WIN 50 μ M y TMZ 550 μ M; de 7D a 7F WIN 50 μ M y TMZ 1100 μ M; de 8A a 8C WIN 100 μ M y TMZ 275 μ M; de 9A a 9C WIN 100 μ M y TMZ 550 μ M; de 10A a 10C WIN 100 μ M y TMZ 1100 μ M; de 11A a 11C BLANCO de DMSO 10% y solución de MTS; de 12A a 12C BLANCO de DMSO 10%. Es el mismo esquema para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

2.6.2.2. 2^{da} Etapa: POST-Tratamiento; donde se administró primero la droga (TMZ) y después se administró el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate).

2.6.2.2.1. POST-Tratamiento de temozolamida más anandamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Se realizó conteo celular manual:

- 1^{er} conteo: 49
- 2^{do} conteo: 49
- 3^{er} conteo: 49
- 4^{to} conteo: 49

El promedio fue $\Rightarrow \bar{X}=49$.

$$\frac{49}{4} = 12.25 \times 2 = 24.5 \times 10^4 = 245000 = 2.45 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1.0 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pozo}}}{2.45 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}} = 0.0408 \frac{\text{ml}}{\text{pozo}} = 40.8 \frac{\mu\text{l}}{\text{pozo}}$$

\Rightarrow La cantidad máxima es de 220 μ L por pozo, se incubó 40.8 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$ de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas por triplicado.

- ⇒ Luego se añadió 139.2µl del medio DMEM sin FBS (medio MDEM blanco) a 37°C y de 5% de CO₂ (180µl-40.8µl=139.2µl).
- ⇒ Se adicionó 20µl de TMZ de (250, 500 y 1000µM), por 12 horas de incubación.
- ⇒ Después de la incubación de la droga, se adicionó el eCB, 20µl de AEA de (5.5, 33 y 110µM), (el ensayo se realizó por triplicado), se incubó por 12, 24 y 48 horas.
- ⇒ Se realizó 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, uno para un periodo de incubación de 12 horas, el segundo para un periodo de incubación de 24 horas y el tercero para un periodo de incubación de 48 horas (Figura II.21).
- ⇒ Además se realizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó un blanco con solo DMSO 10% para evaluar si se encontraba puro, para evitar una falsa respuesta por una posible contaminación (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS, con el fin de corroborar que la solución se encontraba en óptimas condiciones (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Pasada las horas de incubación de cada plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas (12, 24 y 48 horas), se agregó 10µl de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Tabla II.15. Esquema de cantidades usadas para el POST-Tratamiento de temozolamida con anandamida de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONTROL	Temozolamida 25μM			Temozolamida 50μM			Temozolamida 100μM			BLANCO	BLANCO
	TMZ 25μM AEA 0.5μM	TMZ 25μM AEA 3μM	TMZ 25μM AEA 10μM	TMZ 50μM AEA 0.5μM	TMZ 50μM AEA 3μM	TMZ 50μM AEA 10μM	TMZ 100μM AEA 0.5μM	TMZ 100μM AEA 3μM	TMZ 100μM AEA 10μM		
	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 10% DMSO (20μl) + 10% DMSO (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 250 μM TMZ (20μl) + 5.5μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 250 μM TMZ (20μl) + 33μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 5.5μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 33μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 110μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 5.5μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 33μM AEA (20μl) + MTS (10μl)	Células (40.8 μl) + Medio (139.2 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 110μM AEA (20μl) + MTS (10μl)		

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.15, se muestra el esquema del POST-Tratamiento de temozolamida con anandamida en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas para los 3 periodos de incubación. Las concentraciones que se muestra en la tabla en las dos primeras filas se refieren a las concentraciones en los pocillos, mientras que las concentraciones que se indican en las columnas detalladas se refieren a las concentraciones en los viales que se utilizó.

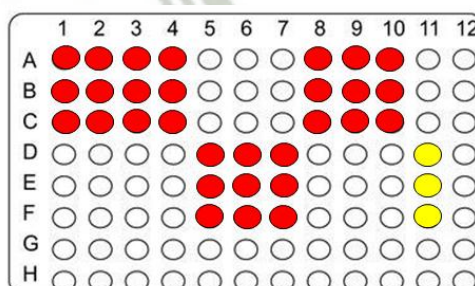


Figura II.21. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos para el POST-Tratamiento de temozolamida con anandamida.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura II.21, se esquematiza del A1 a C1 el CONTROL; de 2A a 2C TMZ 250 μ M y AEA 5.5 μ M; de 3A a 3C TMZ 250 μ M y AEA 33 μ M; de 4A a 4C TMZ 250 μ M y AEA 110 μ M; de 5D a 5F TMZ 500 μ M y AEA 5.5 μ M; de 6D a 6F TMZ 500 μ M y AEA 33 μ M; de 7D a 7F TMZ 500 μ M y AEA 110 μ M; de 8A a 8C TMZ 1000 μ M y AEA 5.5 μ M; de 9A a 9C TMZ 1000 μ M y AEA 33 μ M; de 10A a 10C TMZ 1000 μ M y AEA 110 μ M; de 11D a 11F BLANCO de DMSO 10% y solución de MTS; de 12D a 12F BLANCO de DMSO 10%. Es el mismo esquema para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

2.6.2.2.2. POST-Tratamiento de temozolamida más WIN55,212-2 mesylate con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Se realizó conteo celular manual:

- 1^{er} conteo: 34
- 2^{do} conteo: 34
- 3^{er} conteo: 32
- 4^{to} conteo: 32

El promedio fue $\Rightarrow \bar{X}=33$.

$$\frac{33}{4} = 8.25 \times 2 = 16.5 \times 10^4 = 165000 = 1.65 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1.0 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pozo}}}{1.65 \times 10^5 \frac{\text{células}}{\text{ml}}} = 0.0606 \frac{\text{ml}}{\text{pozo}} = 60.6 \frac{\mu\text{l}}{\text{pozo}}$$

\Rightarrow La cantidad máxima es de 220 μ L por pozo, se incubó 60.6 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$ de células

de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas por triplicado.

\Rightarrow Luego se añadió 119.4 μ L del medio DMEM sin FBS (medio MDem blanco) a 37°C y de 5% de CO₂ (180 μ L-60.6 μ L=119.4 μ L).

\Rightarrow Se adicionó 20 μ L de TMZ de (250, 500 y 1000 μ M), por 12 horas de incubación.

- ⇒ Después de la incubación de la droga, se adicionó el CB, 20µl de WIN de (27.5, 55 y 110µM), (el ensayo se realizó por triplicado), se incubó por 12, 24 y 48 horas.
- ⇒ Se realizó 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, uno para un periodo de incubación de 12 horas, el segundo para un periodo de incubación de 24 horas y el tercero para un periodo de incubación de 48 horas (Figura II.22).
- ⇒ Además se realizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó un blanco con solo DMSO 10% para evaluar si se encontraba puro, para evitar una falsa respuesta por una posible contaminación (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Se realizó otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS, con el fin de corroborar que la solución se encontraba en óptimas condiciones (el ensayo se realizó por triplicado).
- ⇒ Pasada las horas de incubación de cada plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas (12, 24 y 48 horas), se agregó 10µl de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Tabla II.16. Esquema de cantidades usadas para el POST-Tratamiento de temozolamida con WIN55,212-2 mesylate de los 3 platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CONTROL	Temozolamida 25μM			Temozolamida 50μM			Temozolamida 100μM			BLANCO	BLANCO
	TMZ 25μM WIN 2.5μM	TMZ 25μM WIN 5μM	TMZ 25μM WIN 10μM	TMZ 50μM WIN 2.5μM	TMZ 50μM WIN 5μM	TMZ 50μM WIN 10μM	TMZ 100μM WIN 2.5μM	TMZ 100μM WIN 5μM	TMZ 100μM WIN 10μM		
	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 10% DMSO (20μl) + 10% DMSO (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 250 μM TMZ (20μl) + 55μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 250 μM TMZ (20μl) + 110μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 27.5μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 55μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 500 μM TMZ (20μl) + 110μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 27.5μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 55μM WIN (20μl) + MTS (10μl)	Células (60.6 μl) + Medio (119.4 μl) + 1000 μM TMZ (20μl) + 110μM WIN (20μl) + MTS (10μl)		

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla II.16, se muestra el esquema del POST-Tratamiento de temozolamida con WIN55,212-2 mesylate en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas para los 3 periodos de incubación. Las concentraciones que se muestra en la tabla en las dos primeras filas se refieren a las concentraciones en los pocillos, mientras que las concentraciones que se indican en las columnas detalladas se refieren a las concentraciones en los viales que se utilizó.

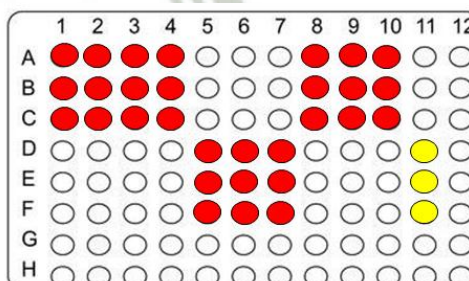


Figura II.22. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos para el POST-Tratamiento de temozolamida con WIN55,212-2 mesylate.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura II.22, se esquematiza del A1 a C1 el CONTROL; de 2A a 2C TMZ 250 μ M y WIN 27.5 μ M; de 3A a 3C TMZ 250 μ M y WIN 55 μ M; de 4A a 4C TMZ 250 μ M y WIN 110 μ M; de 5D a 5F TMZ 500 μ M y WIN 27.5 μ M; de 6D a 6F TMZ 500 μ M y WIN 55 μ M; de 7D a 7F TMZ 500 μ M y WIN 110 μ M; de 8A a 8C TMZ 1000 μ M y WIN 27.5 μ M; de 9A a 9C TMZ 1000 μ M y WIN 55 μ M; de 10A a 10C TMZ 1000 μ M y WIN 110 μ M; de 11D a 11F BLANCO de DMSO 10% y solución de MTS; de 12D a 12F BLANCO de DMSO 10%. Es el mismo esquema para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).





CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CULTIVO CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G

La línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G, demostró un óptimo desarrollo en el procedimiento de cultivo celular utilizado en esta investigación.

Las células fueron cultivadas e incubadas en condiciones de 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal de bovino (FBS) [94] quien aportó los nutrientes necesarios y el FBS proporcionó los factores de crecimiento los cuales fueron importantes para la diferenciación celular.

El número de células/ml y la viabilidad de las generaciones de células producidas para la investigación, no tuvieron diferencia significativa, lo que demostró homogeneidad de los resultados.

En las siguientes figuras (Figura III.1, III.2 y III.3) se puede observar el crecimiento y desarrollo de la línea celular, que se evidencia con el aumento de densidad celular (cantidad de células) de acuerdo al tiempo de incubación.

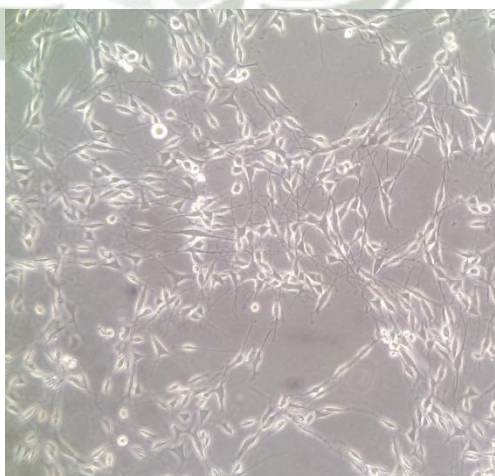


Figura III.1. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio invertido a 12 horas de incubación a 40X.

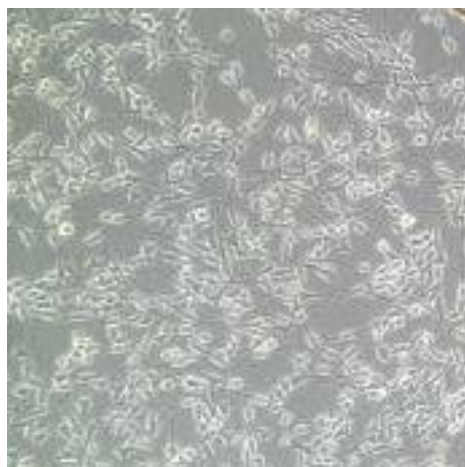


Figura III.2. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio invertido a 24 horas de incubación a 40X.



Figura III.3. Glioblastoma Multiforme Humano T98G visto en microscopio invertido después de tres días de incubación a 40X.

2.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G.

Para realizar los ensayos correspondientes se evaluó si la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G contenía una óptima concentración de proteínas, para ello se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA).

Se realizó un aislamiento de las proteínas de las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G. La suspensión de Glioblastoma Multiforme Humano T98G contenía:

$$M_1 \Rightarrow 1.09 \times 10^7 \text{ células/ml con una viabilidad de } 97.1\%.$$
$$M_2 \Rightarrow 5.75 \times 10^6 \text{ células/ml con una viabilidad de } 95.0\%.$$

Luego se prepararon los estándares diluidos de albúmina (BSA), para lo que se utilizó la Tabla II.4 como guía para preparar un conjunto de estándares de proteínas. También se preparó el reactivo de trabajo BCA (WR), según indicaciones del Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™.

Se realizó el procedimiento en platos de incubación para crecimiento celular transparente de 96 celdas, para establecer la relación entre una cierta concentración de proteína y una cierta absorción, para ello se adicionó 25µL de cada estándar, los estándares se hicieron por cuadruplicado, y a las 2 últimas columnas se adiciono 25µL de las muestras 1 y 2, las muestras se hicieron también por cuadruplicado; a cada pocillo se agregó 200µL del WR (Figura III.4). Posteriormente, se llevó a la incubadora por 30 minutos y pasado el tiempo se esperó unos 5 minutos a que enfríe, en donde se lleva a cabo la reacción y se determinó, en un espectrofotómetro, la absorción de cada muestra.

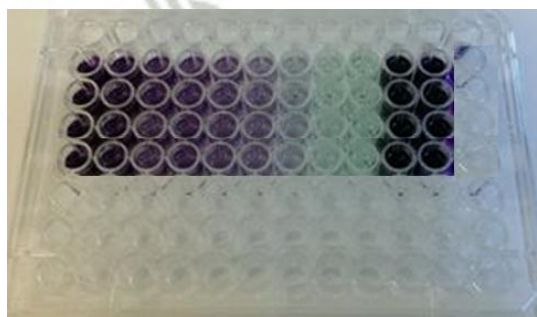


Figura III.4. Plato transparente de crecimiento celular de 96 pozos con muestra 1 y 2, después que se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 562nm.

Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{2+} a Cu^{1+} . El ión cuproso Cu^{1+} producido se une a dos moléculas de BCA y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica de tal manera que ahora absorbe luz a 562nm y aparece un color púrpura. Formación de color influenciado por cisteína, cistina, tirosina y triptófano.

En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente en un amplio rango de trabajo (20-2000 $\mu\text{g/ml}$). En la lectura del espectrofotómetro, salieron los valores de absorbancia (Figura III.5) y con ello se realizó una gráfica de la relación entre proteína concentración $\mu\text{g/ml}$ y absorción a 562nm. Se utilizó el promedio de los tres valores encontrados para cada concentración de la muestra 3.

St A	St B	St C	St D	St E	St F	St G	St H	St I	Muestra 1	Muestra 2
1.682	1.52	0.757	0.847	0.348	0.198	0.159	0.109	0.075	0.351	0.321
2.013	1.528	0.793	0.894	0.421	0.265	0.156	0.09	0.08	0.147	0.51
2.051	1.583	0.791	0.974	0.397	0.274	0.155	0.197	0.076	0.284	0.423
2.51	1.609	0.906	0.924	0.329	0.239	0.152	0.101	0.075	0.337	0.532

Figura III.5. Valores de absorbancia de los estándares y de la muestra 1 y 2 en el espectrofotómetro a 562nm.

Luego se saca promedio de cada columna de los estándares porque se hicieron por cuadruplicado, y al resultado se resta el blanco (Tabla III.1), para tener las absorbancias finales que fueron usadas para elaborar la curva estándar de BSA (Tabla III.2) por el método del ácido Bicinconínico (BCA).

Tabla III.1. Valores de absorbancias de los estándares.

Promedio	2.0640	1.5600	0.81175	0.90975	0.37375	0.24400	0.15550	0.12425	0.07650
Promedio-Blanco	1.9875	1.4835	0.73525	0.83325	0.29725	0.1675	0.0790	0.04775	0

Fuente: Elaboración propia.

Tabla III.2. Valores que fueron usadas para elaborar la curva estándar de BSA.

Concentración a 562nm	Absorbancia (µg/ml)
2000	1.9875
1500	1.4835
1000	0.73525
750	0.83325
500	0.29725
250	0.1675
125	0.079
25	0.04775
0	0

Fuente: Elaboración propia.

Salieron los valores de absorbancia y con ello se realizó una gráfica (Figura III.6) de la relación entre proteína concentración µg/ml y absorción a 562nm.

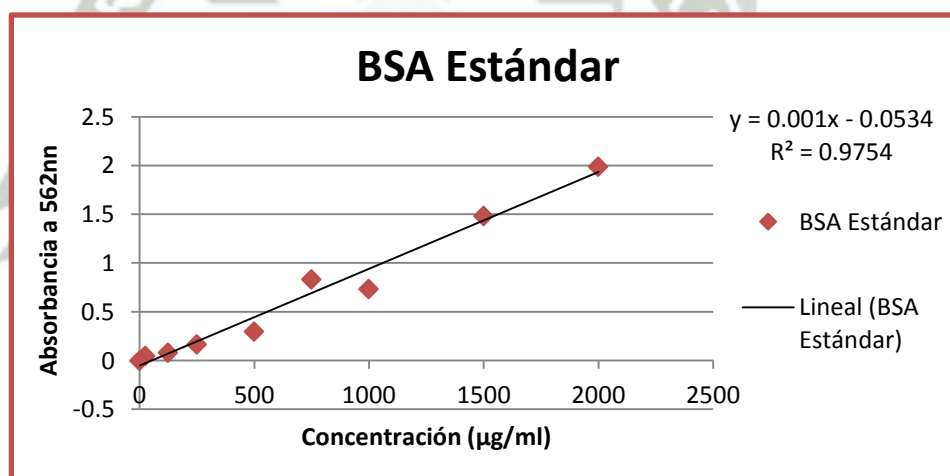


Figura III.6. Curva estándar de BSA por el método del ácido Bicinonónico (BCA).

Fuente: Elaboración propia.

La gráfica de la Figura III.6, demostró linealidad y esto corroboró que la ecuación de la curva estándar de BSA proporciona la confiabilidad de los resultados en esta investigación.

Cálculos para determinar la concentración de proteína de cada muestra:

▪ Muestra 1:

$$Y = 0.001X - 0.0534$$

$$0.20325 = 0.001(X) - 0.0534$$

$$X = 256.65\mu g/ml$$

▪ Muestra 2:

$$Y = 0.001X - 0.0534$$

$$0.3700 = 0.001(X) - 0.0534$$

$$X = 423.40\mu g/ml$$

Se demostró que la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G en esta investigación contenía una óptima concentración de proteínas.

3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB₁ EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO T98G MEDIANTE WESTERN BLOT.

Para evaluar la presencia y cuantificar la densidad del receptor cannabinoide CB₁ presente en células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se utilizó la técnica analítica de Western Blot. El análisis se realizó siguiendo métodos estándares, para ello se cultivó células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G y la suspensión final es la que se utilizó para realizar el aislamiento de las proteínas en la cual la muestra presentó una óptima viabilidad.

$$M_3 \Rightarrow 5.80 \times 10^6 \text{ células/ml con una viabilidad de } 95.1\%.$$

Se corroboró si la muestra 3 presentaba una concentración óptima de proteínas para lo que se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA), en donde demostró contener una óptima concentración de proteínas, que evidenciaría la expresión del receptor cannabinoide CB₁.

$$\text{Concentración de proteínas de la muestra 3} = 1198.333\mu g/ml$$

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), en donde se cargó las muestras en los hoyos (5-40µL por duplicado), al primer hoyo se adicionó ab116027 Prism Ultra protein Ladder (10-180kDa) Abcam® (Molecular weight ladder).

Se realizó la transferencia del gel de poliacrilamida con SDS a una membrana de nitrocelulosa, para realizar el bloqueo y poder añadir el 1° anticuerpo primario (1° Ab) específico para la proteína diana a la membrana, se usó el Ab23703 anticuerpo anti-receptor de cannabinoides 1 (60kDa) Abcam®, seguido por el 2° anticuerpo secundario (2° Ab) ligado a enzimas que se unen al anticuerpo primario de la membrana, se usó el Ab97069 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (67kDa) Abcam®.

Se añadió el Anticuerpo Anti-Actina, se usó el Ab49900 Anti-beta Actin antibody [AC-15] (HRP) (42kDa) Abcam®, el cual al final se lavó con Washing buffer (TBST) durante 5 minutos en un rotador a temperatura ambiente por 3 veces para su detección y observar si se han unido a la proteína de interés.

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en un pocillo de plástico, donde se adicionó la solución de TMB (Figura III.7) sobre la membrana hasta cubrirla por completo en el rotador por 5 min. Esta solución desarrolla un color azul oscuro, producto de la reacción insoluble en presencia de HRP. Antes de la reacción con HRP, la solución es incolora a amarillo claro.

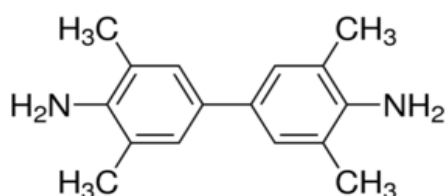


Figura III.7. Estructura química del 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Fuente: Elaboración propia.

Se aplicó el método colorimétrico (bandas de color), donde la detección depende de la incubación de la membrana de nitrocelulosa con un sustrato que reacciona gracias a la enzima HRP (horse radish peroxidase) unida al anticuerpo secundario (Figura III.8). Pasa así de ser un compuesto soluble a una forma insoluble de otro color que precipita cerca de la enzima tiñendo así la membrana.

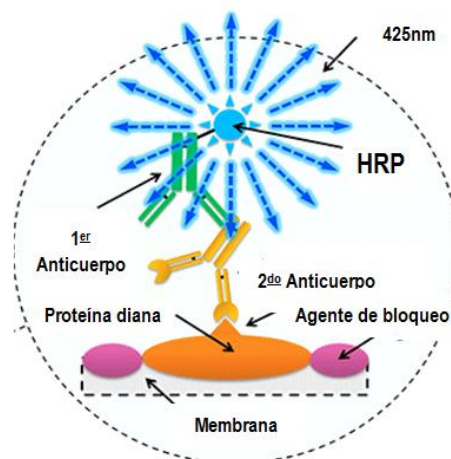


Figura III.8. Anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano.

Fuente: <http://shop.expdeon.com/products/103-Western-Blot-Substrates/475-ECL-Pico>.

Se procedió después al lavado con agua destilada en el que se elimina el tinte soluble y se colocó en el hand scanner para leer consiguiéndose así una imagen digital del Western Blot (Figura III.9) que fue analizado por el peso molecular.

La Figura III.9 certifica los resultados de la técnica analítica de Western Blot, los cuales fueron separados por bandas de las diferentes proteínas presentes en la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G. La detección empleada fue la colorimétrica, que dependió de la incubación de la membrana de nitrocelulosa con un sustrato unido al anticuerpo secundario; la enzima usada fue HRP (una peroxidasa) la que produjo una reacción que acabó en un cambio de color (azul), y gracias a ello se pudo evidenciar las bandas.

La cuantificación proteica se evalúa por la intensidad o densidad de la proteína que se justifica con las manchas, guiadas por un protocolo de escalera según su peso molecular como Prism Ultra protein Ladder (10-180kDa) de Abcam® que fue el

elegido en esta técnica. En la columna 8 y 9 se observa unas manchas más gruesas en comparación al resto y esto se debe a la cantidad empleada de 40µL de muestra. Así la banda de 60kDa en la membrana de nitrocelulosa indica la presencia del anticuerpo del anti-receptor CB₁. Seguido se observa la banda de 67kDa que es del anticuerpo secundario Ab97069Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed utilizado de Abcam®.

Para esta técnica analítica se usó β-Actina como un control interno evidenciado por su peso molecular de 42kDa, el cual garantizó la veracidad de los resultados. Los resultados mostraron claramente la evidencia del receptor CB₁ en células de glía (Glioblastoma Multiforme Humano T98G, línea celular empleada).

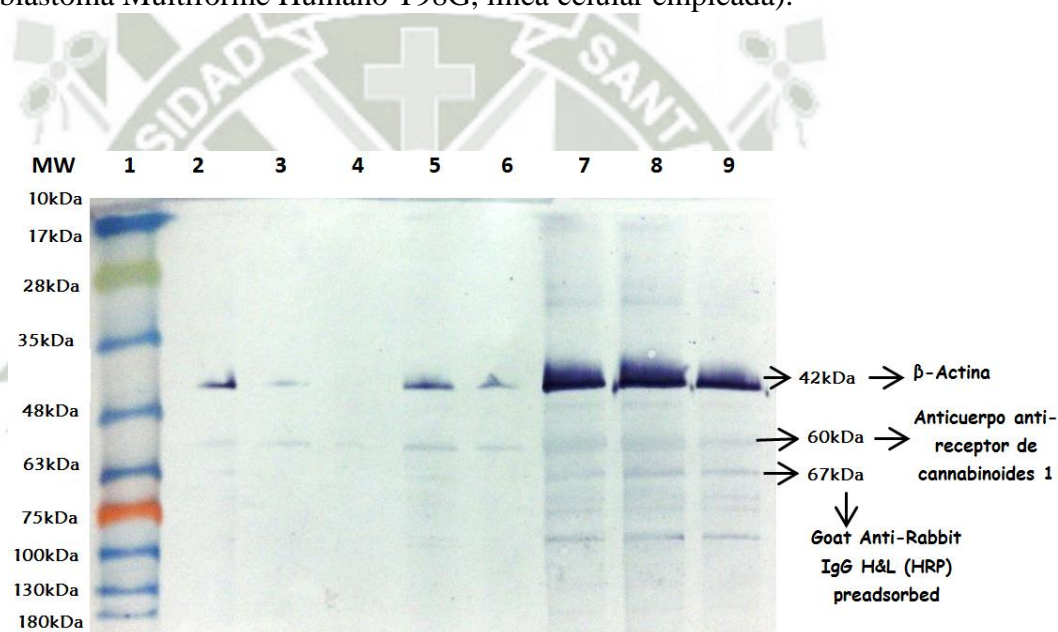


Figura III.9. Análisis de Western Blot, expresión del receptor de cannabinoides CB₁ en células de Glioblastoma multiforme humano T98G.

Para el almacenamiento de la membrana de nitrocelulosa, se lavó con reactivo Fluorescent Western Blot Stripping buffer 5X por 15 minutos, luego se lavó con TBS1X y se agregó el Blocking buffer (asegurándose de que se cubra completamente la membrana) y se colocó en el refrigerador, siendo estable hasta 1 mes.

4. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS.

La evaluación de la viabilidad celular de los cultivos fue necesaria para poder determinar el sinergismo y la citotoxicidad de la anandamida, WIN55,212-2 mesylate y la temozolamida, solos y en combinación sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G. Para ello se realizó un tratamiento individual y un tratamiento combinado en dos etapas.

4.1. Tratamiento Individual con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

4.1.1. Anandamida:

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de anandamida fueron 0.5, 3 y 10 μM , las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración $44.94 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO_2 durante 12 horas, 24 horas y 48 horas; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10 μL de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar la citotoxicidad sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Porcentaje de viabilidad de anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

	Concentración (μM)	CONTROL	ANANDAMIDA		
			0.5 μM	3 μM	10 μM
12 HORAS	Viabilidad (%)	100	98.67484	90.88951	80.68577
	Desviación Estándar	2.896329	7.382518	4.776875	7.809046
24 HORAS	Viabilidad (%)	100	86.36019	72.54357	69.36095
	Desviación Estándar	2.994219	5.8029	13.25963	5.01044
48 HORAS	Viabilidad (%)	100	79.25554	70.97449	62.23338
	Desviación Estándar	10.30922	6.79088	2.062963	3.80364

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de anandamida (0.5, 3 y 10 μM) a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); pero se puede destacar que la anandamida a 10 μM en 48 horas produce un efecto sobre la viabilidad celular (citotoxicidad) en comparación al grupo control (células sin daño alguno), como se expresa en la Figura III.10.

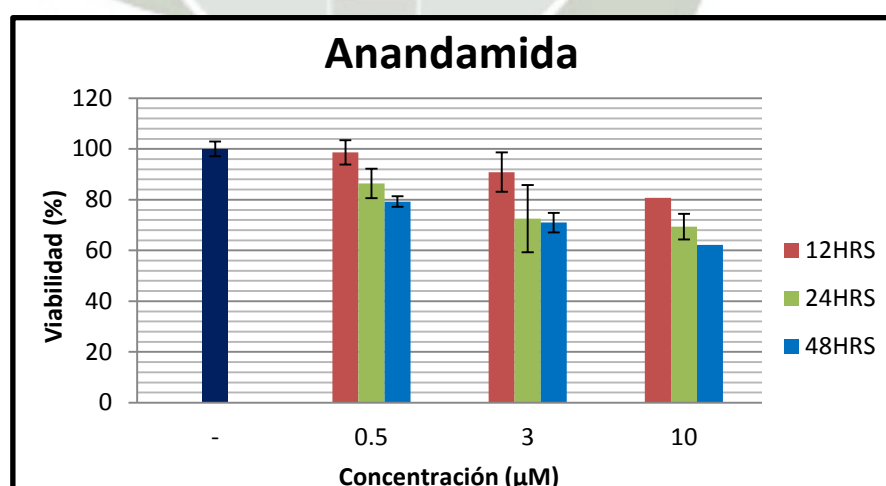


Figura III.10. Efecto de anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.1.2. WIN55,212-2 mesylate:

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de WIN55,212-2 mesylate fueron 2.5, 5 y 10 μM , las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración $44.94 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO_2 durante 12 horas, 24 horas y 48 horas; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10 μL de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar la citotoxicidad sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

	Concentración (μM)	CONTROL	WIN55,212-2 mesylate		
			2.5 μM	5 μM	10 μM
12 HORAS	Viabilidad (%)	100	40.35117	27.08299	20.55657
	Desviación Estándar	2.896329	7.434849	6.022222	2.3896
24 HORAS	Viabilidad (%)	100	31.97777	28.41627	27.88583
	Desviación Estándar	2.994219	3.241909	0.487176	0.504546
48 HORAS	Viabilidad (%)	100	66.91761	60.39314	61.89879
	Desviación Estándar	10.30922	6.366109	1.75808	5.72417

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control.

Se demostró que se encuentra una gran diferencia significativa entre las concentraciones de WIN55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10 μ M) a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); destacando que el WIN55,212-2 mesylate a 10 μ M en 12 horas produce un efecto sobre la viabilidad celular, ocasionando un aproximado de 20% de citotoxicidad (daño en las células) en comparación al grupo control (células sin daño alguno), como se expresa en la Figura III.11.

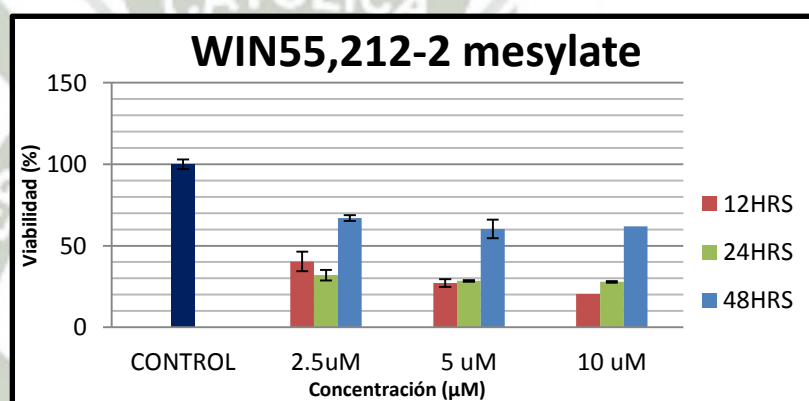


Figura III.11. Efecto de WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.1.3. Temozolamida:

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de temozolamida fueron 25, 50 y 100 μ M, las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración $44.94 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO₂ durante 12 horas, 24 horas y 48 horas; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10 μ l de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar la citotoxicidad sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.5.

Tabla III.5. Porcentaje de viabilidad de temozolamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

	Concentración (μ M)	CONTROL	Temozolamida		
			25 μ M	50 μ M	100 μ M
12 HORAS	Viabilidad (%)	100	95.69323	97.69753	91.08829
	Desviación Estándar	2.896329	2.25454	8.21949	12.10325
24 HORAS	Viabilidad (%)	100	96.46375	93.53372	86.71382
	Desviación Estándar	2.994219	8.509065	16.54589	11.8955
48 HORAS	Viabilidad (%)	100	79.42284	96.31953	100.3346
	Desviación Estándar	10.30922	5.405456	5.413196	4.332519

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de temozolamida (25, 50 y 100 μ M) a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) como se expresa en la Figura III.12; evidenciando así que puede ser administrada a cualquier tiempo, pero a la concentración de 25 μ M sería la más recomendable con el fin de no crear resistencia.

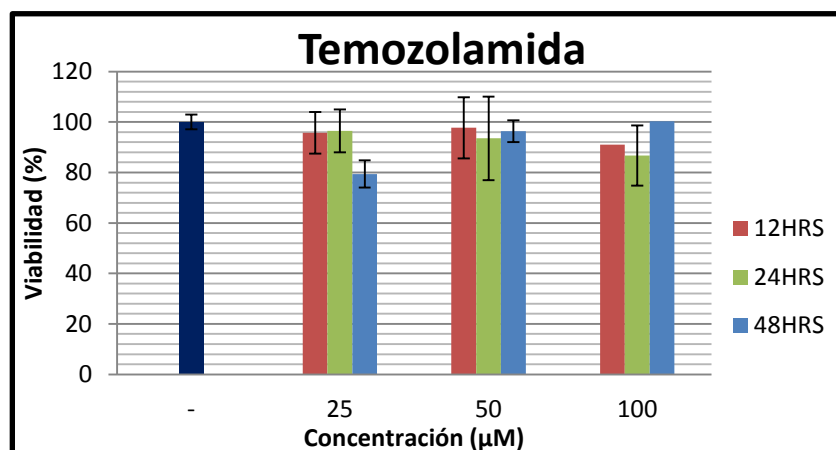


Figura III.12. Efecto de temozolamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Tratamiento Combinado con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G

4.2.1. 1^{ra} Etapa: PRE-Tratamiento; donde se administró primero el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate) y después se administró la droga (TMZ).

4.2.1.1. PRE-Tratamiento de anandamida más temozolamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de anandamida fueron 0.5, 3 y 10µM; y temozolamida fueron 25, 50 y 100µM, las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración $64.6 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO₂ durante 12 horas, 24 horas y 48 horas primero el eCB y pasado cada periodo se adicionó la droga por 12 horas de incubación; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10µl de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de anandamida & temozolamida a 25 μ M sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 25 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento AEA&TMZ 25 μ M			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	5.482008
12HORAS	AEA 0.5 μ M & TMZ 25 μ M	137.729765	20.38547
	AEA 3 μ M & TMZ 25 μ M	76.5881974	11.84381
	AEA 10 μ M & TMZ 25 μ M	57.3685908	3.108347
24HORAS	AEA 0.5 μ M & TMZ 25 μ M	116.315261	4.535609
	AEA 3 μ M & TMZ 25 μ M	78.0120482	8.01218
	AEA 10 μ M & TMZ 25 μ M	70.9337349	12.16652
48HORAS	AEA 0.5 μ M & TMZ 25 μ M	90.3757077	7.98167
	AEA 3 μ M & TMZ 25 μ M	77.1487391	10.20017
	AEA 10 μ M & TMZ 25 μ M	87.9567679	14.29768

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de anandamida (0.5, 3 y 10 μ M) con la temozolamida a 25 μ M a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); Aunque se aprecia un ligero sinergismo en la asociación de anandamida 10 μ M con la temozolamida a 25 μ M en el periodo de 12 horas de incubación, lo que puede indicar que produce un efecto sobre la viabilidad celular (citotoxicidad) en comparación al grupo control, como se expresa en la Figura III.13.

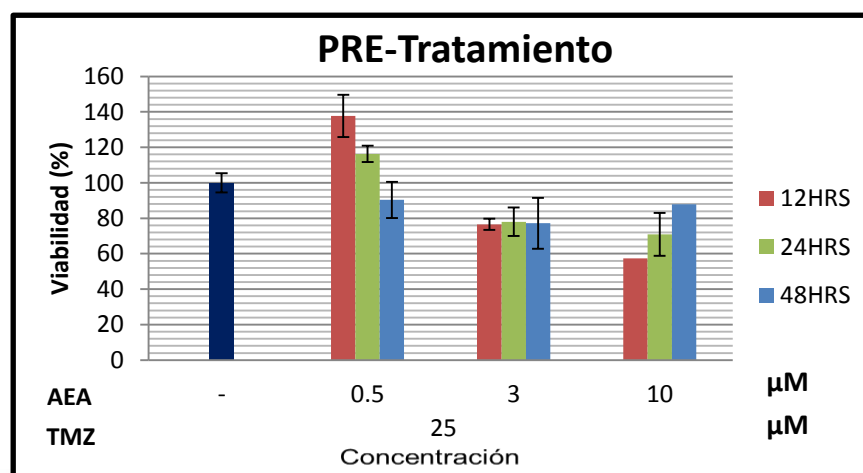


Figura III.13. Efecto de anandamida & temozolamida a 25μM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de temozolamida de 50μM con anandamida sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas de anandamida como se observa en la Tabla III.7.

Tabla III.7. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 50μM, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento AEA&TMZ 50 μM			
	Concentración (μM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	5.48201
12HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 50 μM	83.0699774	5.47261
	AEA 3μM & TMZ 50 μM	82.3927765	9.303437
	AEA 10μM & TMZ 50 μM	63.8503708	8.23983
24HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 50 μM	109.789157	3.013303
	AEA 3μM & TMZ 50 μM	74.4477912	4.910193
	AEA 10μM & TMZ 50 μM	67.6204819	3.651914
48HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 50 μM	94.5959856	16.24167
	AEA 3μM & TMZ 50 μM	82.1924858	7.664753
	AEA 10μM & TMZ 50 μM	78.4354092	7.36443

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de anandamida (0.5, 3 y 10μM) con la temozolamida a 50μM a los diferentes

tiempos 12, 24 y 48 horas); pero se observó que a las 12 horas de incubación se produce un sinergismo entre el endocannabinoide y la temozolamida sobre la línea celular con una viabilidad menor a 80% en comparación al grupo control, como se demuestra en la Figura III.14.

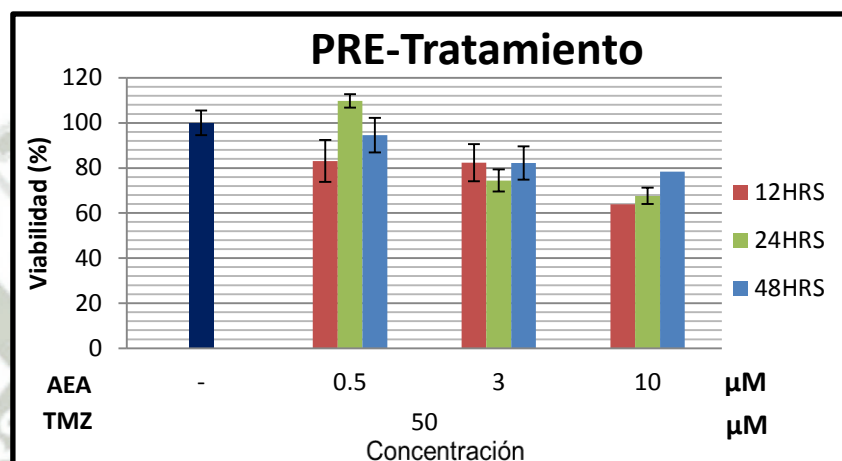


Figura III.14. Efecto de anandamida & temozolamida a 50μM sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de anandamida & temozolamida a 100μM sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas de anandamida como se observa en la Tabla III.8.

Tabla III.8. Porcentaje de viabilidad de anandamida & temozolamida a 100μM, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento AEA&TMZ 100 μM			
	Concentración (μM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	5.48201
12HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 100 μM	68.3005482	3.262597
	AEA 3μM & TMZ 100 μM	88.1489842	8.414137
	AEA 10μM & TMZ 100 μM	53.6923573	2.925309
24HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 100 μM	111.696787	4.442984
	AEA 3μM & TMZ 100 μM	75.8032129	2.363706
	AEA 10μM & TMZ 100 μM	68.8253012	5.282546
48HORAS	AEA 0.5μM & TMZ 100 μM	109.624292	7.674078
	AEA 3μM & TMZ 100 μM	81.5234174	9.572826
	AEA 10μM & TMZ 100 μM	78.4354092	6.828619

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de anandamida (0.5, 3 y 10 μ M) con la temozolamida a 100 μ M a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); pero se observó que en el periodo de 12 horas de incubación se produce un sinergismo entre el endocannabinoide a 10 μ M y la temozolamida a 100 μ M sobre la línea celular con una viabilidad menor a 60% en comparación al grupo control, como se demuestra en la Figura III.15.

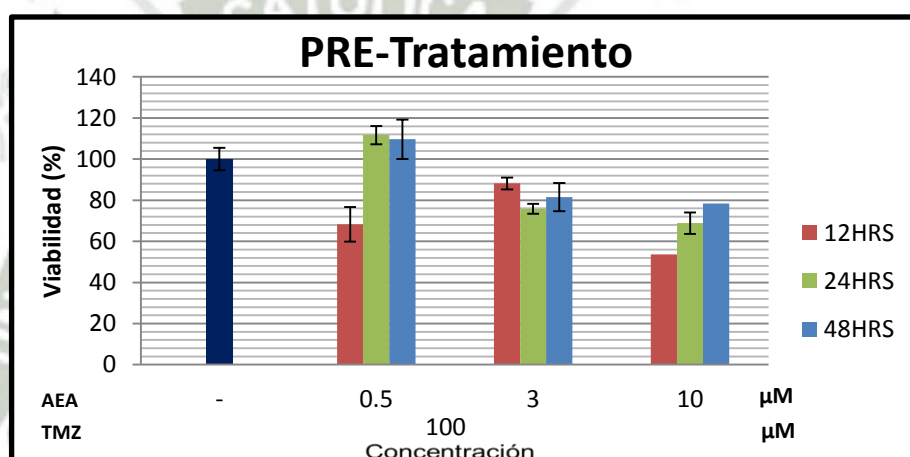


Figura III.15. Efecto de anandamida & temozolamida a 100 μ M sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.1.2. PRE-Tratamiento de WIN55,212-2 mesylate más temozolamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de WIN55,212-2 mesylate fueron 0.5, 3 y 10 μ M y Temozolamida fueron 25, 50 y 100 μ M, las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración 35.8 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO₂ durante 12 horas, 24 horas y 48 horas primero el CB y pasado cada periodo se adicionó la droga por 12 horas de incubación;

cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10µl de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 25µM sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas de WIN55,212-2 mesylate como se observa en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 25µM, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento WIN & TMZ 25 µM			
	Concentración (µM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	0.972019
12HORAS	WIN 2.5µM & TMZ 25 µM	58.45927	1.824828
	WIN 5µM & TMZ 25 µM	56.32142	5.874564
	WIN 10µM & TMZ 25 µM	56.87431	1.01347
24HORAS	WIN 2.5µM & TMZ 25 µM	59.5137	2.726085
	WIN 5µM & TMZ 25 µM	58.81899	3.594946
	WIN 10µM & TMZ 25 µM	58.51023	6.35063
48HORAS	WIN 2.5µM & TMZ 25 µM	78.05353	7.758315
	WIN 5µM & TMZ 25 µM	82.0438	9.239081
	WIN 10µM & TMZ 25 µM	77.90754	8.11544

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de WIN55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10µM) con la temozolamida a 25µM a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); pero se observó que en el periodo de 12 horas de incubación se produce un sinergismo entre el cannabinoide a 5µM y la

temozolamida a 25 μ M sobre la línea celular con una viabilidad menor a 60% en comparación al 100% del grupo control, como se demuestra en la Figura III.16.

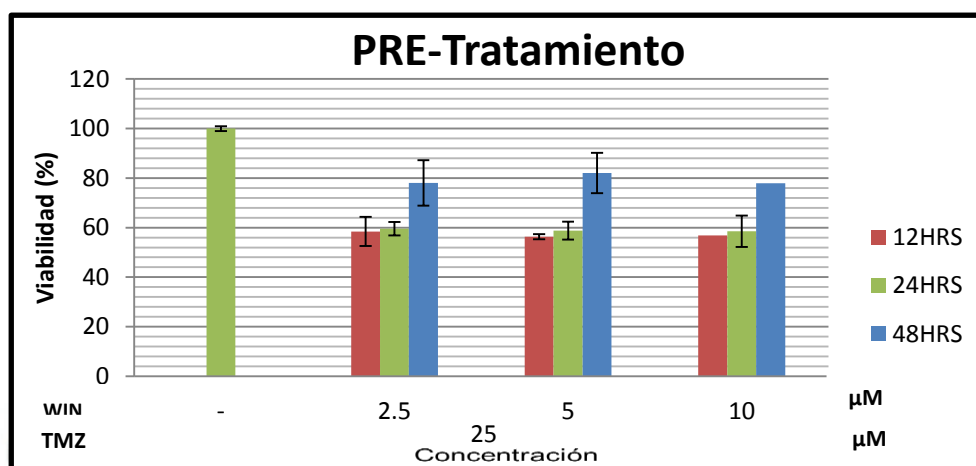


Figura III.16. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 25 μ M sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 50 μ M sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que se realizó por triplicado), de las diferentes concentraciones de WIN55,212-2 mesylate trabajadas como se observa en la Tabla III.10.

Tabla III.10. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 50 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento WIN & TMZ 50 μ M			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	0.972019
12HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 50 μ M	50.93992	3.221998
	WIN 3 μ M & TMZ 50 μ M	55.14191	1.134892
	WIN 10 μ M & TMZ 50 μ M	52.93034	1.291137
24HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 50 μ M	57.50675	4.946807
	WIN 3 μ M & TMZ 50 μ M	56.3875	2.561275
	WIN 10 μ M & TMZ 50 μ M	56.11733	4.248446
48HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 50 μ M	76.73966	9.932731
	WIN 3 μ M & TMZ 50 μ M	76.54501	10.16566
	WIN 10 μ M & TMZ 50 μ M	73.28467	7.815788

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de WIN55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10 μ M) con la temozolamida a 50 μ M a los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas); pero definitivamente hay un mejor resultado a la administración de 12 horas en comparación al periodo de 48 horas. Se produce un sinergismo entre el cannabinoide y la temozolamida al periodo de 12 horas de incubación sobre la línea celular evidenciado por una viabilidad menor a 60% en comparación al grupo control, como se demuestra en la Figura III.17.

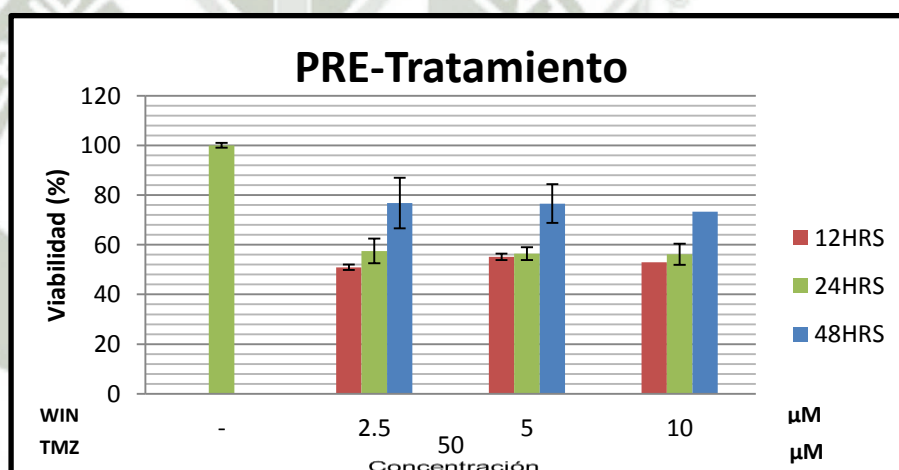


Figura III.17. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 50 μ M sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 100 μ M sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.11.

Tabla III.11. Porcentaje de viabilidad de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 100 μ M, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

PRE-Tratamiento WIN & TMZ 100 μ M			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	0.972019
12HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 100 μ M	54.77331	1.154475
	WIN 3 μ M & TMZ 100 μ M	57.57464	5.094227
	WIN 10 μ M & TMZ 100 μ M	57.68522	0.710922
24HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 100 μ M	61.01891	4.582431
	WIN 3 μ M & TMZ 100 μ M	59.5523	4.889107
	WIN 10 μ M & TMZ 100 μ M	57.19799	4.01816
48HORAS	WIN 2.5 μ M & TMZ 100 μ M	79.56204	9.325181
	WIN 3 μ M & TMZ 100 μ M	81.07056	8.908699
	WIN 10 μ M & TMZ 100 μ M	77.51825	5.203173

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encuentra una diferencia significativa entre las concentraciones de WIN55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10 μ M) con la temozolamida a 100 μ M a las 12 horas, lo que demuestra el sinergismo generado entre el cannabinoide y la temozolamida con una viabilidad menor a 60% por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células; pero no hay diferencia significativa entre las tres concentraciones trabajadas de WIN55,212-2 mesylate, como se demuestra en la Figura III.18.

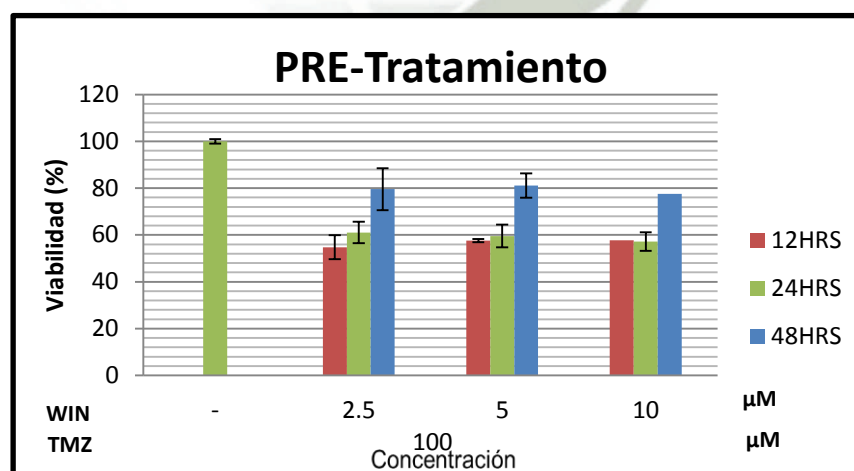


Figura III.18. Efecto de WIN55,212-2 mesylate & temozolamida a 100 μ M sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.2. 2^{da} Etapa: POST-Tratamiento; donde se administró primero la droga (TMZ) y después se administró el CB o eCB (AEA, WIN55,212-2 mesylate).

4.2.2.1. POST-Tratamiento de temozolamida más anandamida con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de temozolamida fueron 25, 50 y 100 μ M; y anandamida fueron 0.5, 3 y 10 μ M, las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración 40.8 $\frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO₂ durante 12 horas primero el eCB y pasado ese periodo se adicionó la droga por 12 horas, 24 horas y 48 horas de incubación; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10 μ l de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 25 μ M & anandamida a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 25 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

POST-Tratamiento TMZ 25 μ M & AEA			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	8.4327594
12HORAS	TMZ 25 μ M & AEA 0.5 μ M	115.9916	6.431516
	TMZ 25 μ M & AEA 3 μ M	70.32123	1.6290514
	TMZ 25 μ M & AEA 10 μ M	51.58287	1.823231
24HORAS	TMZ 25 μ M & AEA 0.5 μ M	89.69964	7.876966
	TMZ 25 μ M & AEA 3 μ M	67.46988	2.303827
	TMZ 25 μ M & AEA 10 μ M	33.87069	2.232993
48HORAS	TMZ 25 μ M & AEA 0.5 μ M	130.1184	19.52991
	TMZ 25 μ M & AEA 3 μ M	62.73564	4.974101
	TMZ 25 μ M & AEA 10 μ M	60.32442	1.9786557

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encontró una diferencia significativa entre temozolamida a 25 μ M & anandamida a 10 μ M a las 24 horas en comparación al grupo control. Esto demuestra el sinergismo generado entre el endocannabinoide y la temozolamida evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células como se observa en la Figura III.19.

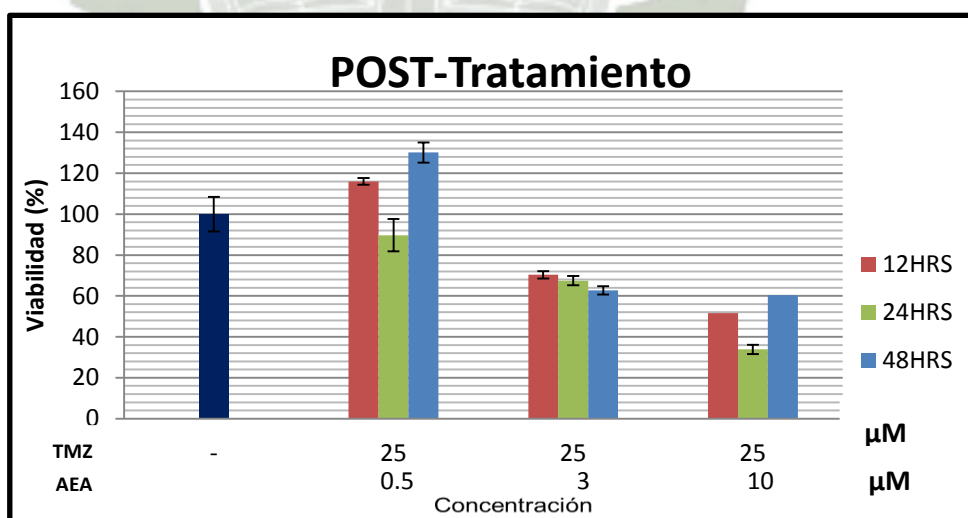


Figura III.19. Efecto de temozolamida a 25 μ M & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 50 μ M & anandamida a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 50 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

POST-Tratamiento TMZ 50 μ M & AEA			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	8.4327594
12HORAS	TMZ 50 μ M & AEA 0.5 μ M	94.41341	9.26523
	TMZ 50 μ M & AEA 3 μ M	58.72905	4.581707
	TMZ 50 μ M & AEA 10 μ M	52.74674	3.3669389
24HORAS	TMZ 50 μ M & AEA 0.5 μ M	68.28441	13.103014
	TMZ 50 μ M & AEA 3 μ M	43.13592	6.479512
	TMZ 50 μ M & AEA 10 μ M	36.28033	4.123641
48HORAS	TMZ 50 μ M & AEA 0.5 μ M	122.3586	11.925
	TMZ 50 μ M & AEA 3 μ M	71.153	7.727737
	TMZ 50 μ M & AEA 10 μ M	63.39325	1.297558

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encontró una diferencia significativa entre temozolamida a 50 μ M & anandamida a 10 μ M a las 24 horas en comparación al grupo control. Esto demuestra el sinergismo generado entre la temozolamida y el endocannabinoide evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células representado por la viabilidad menor a 70% como se observa en la Figura III.20.

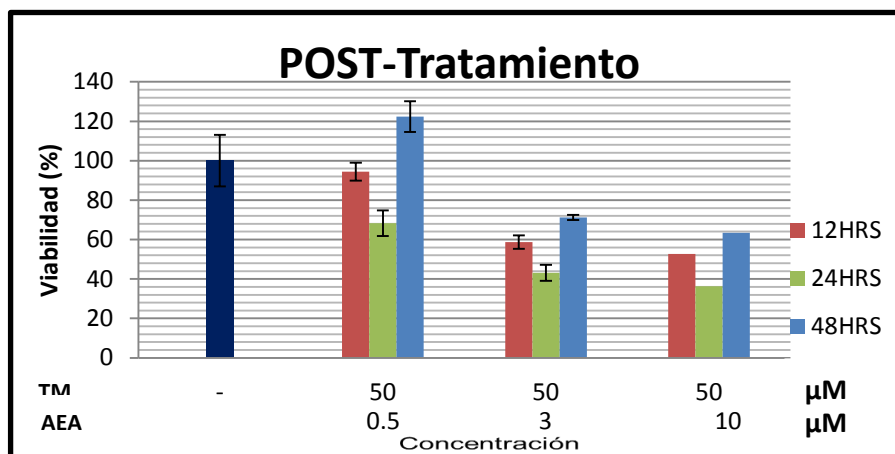


Figura III.20. Efecto de temozolamida a 50 μ M & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 100 μ M & anandamida a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.14.

Tabla III.14. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 100 μ M & anandamida, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

POST-Tratamiento TMZ 100 μ M & AEA			
	Concentración (μ M)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	8.4327594
12HORAS	TMZ 100 μ M & AEA 0.5 μ M	81.33147	5.345325
	TMZ 100 μ M & AEA 3 μ M	68.01676	5.697032
	TMZ 100 μ M & AEA 10 μ M	53.39851	1.859512
24HORAS	TMZ 100 μ M & AEA 0.5 μ M	100.1018	7.559431
	TMZ 100 μ M & AEA 3 μ M	64.75479	6.97741
	TMZ 100 μ M & AEA 10 μ M	36.01967	2.277427
48HORAS	TMZ 100 μ M & AEA 0.5 μ M	134.1517	17.78328
	TMZ 100 μ M & AEA 3 μ M	63.26173	4.818659
	TMZ 100 μ M & AEA 10 μ M	43.56469	1.222039

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encontró una diferencia significativa entre temozolamida a 10 μ M & anandamida a 10 μ M a las 24 horas en comparación al grupo control. Esto

demuestra el sinergismo generado entre la temozolamida y el endocannabinoide evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células representado por la viabilidad menor a 70% como se demuestra en la Figura III.21.

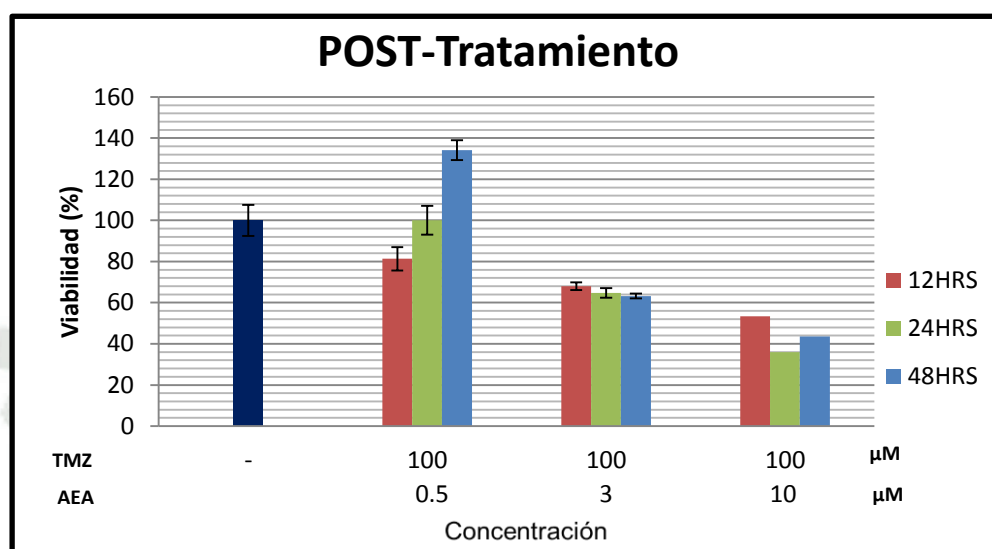


Figura III.21. Efecto de temozolamida a 100μM & anandamida sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.2.2. POST-Tratamiento de temozolamida más WIN55,212-2 mesylate con células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el plato de crecimiento celular transparente de 96 celdas.

Las concentraciones utilizadas en esta investigación de temozolamida fueron 25, 50 y 100μM; WIN55,212-2 mesylate fueron 2.5, 5 y 10μM, las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G se colocaron en platos de crecimiento celular transparente de 96 celdas a una concentración $60.6 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$; se incubaron a 37°C y de 5% de CO₂ durante 12 horas primero el eCB y pasado ese periodo se adicionó la droga por 12 horas, 24 horas y 48 horas de incubación; cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control de DMSO 10% con las células en medio DMEM sin FBS, un blanco con solo DMSO 10% y otro blanco con DMSO 10% y solución de MTS. El ensayo se realizó por triplicado.

Después de cumplido este proceso se agregó 10µl de solución de MTS y se llevo a incubar durante 3 horas más. La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminada las 3 horas en un espectrofotómetro de 96 pozos a 490nm.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar la citotoxicidad sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 25µM & WIN55,212-2 mesylate a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 25µM & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

	POST-Tratamiento TMZ 25 µM & WIN		
	Concentración (µM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	2.434185
12HORAS	TMZ 25 µM & WIN 2.5µM	55.95455	2.143123
	TMZ 25 µM & WIN 5µM	52.04545	1.626866
	TMZ 25 µM & WIN 10µM	49.31818	2.566874
24HORAS	TMZ 25 µM & WIN 2.5µM	84.30645	1.6072738
	TMZ 25 µM & WIN 5µM	79.919	2.837374
	TMZ 25 µM & WIN 10µM	78.97401	5.528342
48HORAS	TMZ 25 µM & WIN 2.5µM	90.10297	2.17316
	TMZ 25 µM & WIN 5µM	89.41648	1.299521
	TMZ 25 µM & WIN 10µM	94.27918	7.87793

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encontró una diferencia significativa a las 12 horas en comparación al grupo control.

Esto demuestra el sinergismo generado entre la temozolamida y el cannabinoide evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células representado por la viabilidad menor a 60% como se demuestra en la Figura III.22.

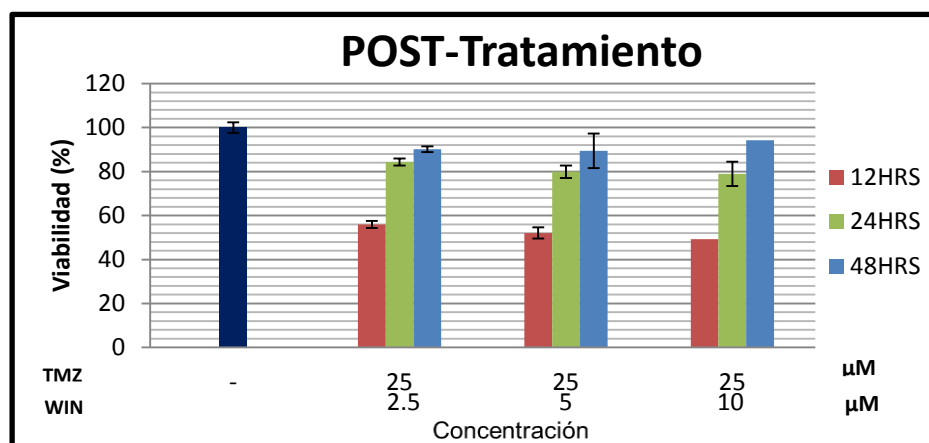


Figura III.22. Efecto de temozolamida a 25μM & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar el sinergismo sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 50μM & WIN55,212-2 mesylate a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.16.

Tabla III.16. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 50μM & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

POST-Tratamiento TMZ 50 μM & WIN			
	Concentración (μM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	2.434185
12HORAS	TMZ 50 μM & WIN 2.5μM	53.86364	1.159759
	TMZ 50 μM & WIN 5μM	54.45455	1.803921
	TMZ 50 μM & WIN 10μM	55.22727	3.83842
24HORAS	TMZ 50 μM & WIN 2.5μM	89.30138	7.66643
	TMZ 50 μM & WIN 5μM	87.20891	9.149062
	TMZ 50 μM & WIN 10μM	88.96389	11.09309
48HORAS	TMZ 50 μM & WIN 2.5μM	101.1442	3.274391
	TMZ 50 μM & WIN 5μM	100.7437	4.870434
	TMZ 50 μM & WIN 10μM	108.0092	10.78918

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que

se encontró una diferencia significativa a las 12 horas produciendo un efecto sobre la viabilidad celular en comparación al grupo control. Esto demuestra el sinergismo generado entre la temozolamida y el cannabinoide evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células representado por la viabilidad menor a 60% como se demuestra en la Figura III.23.

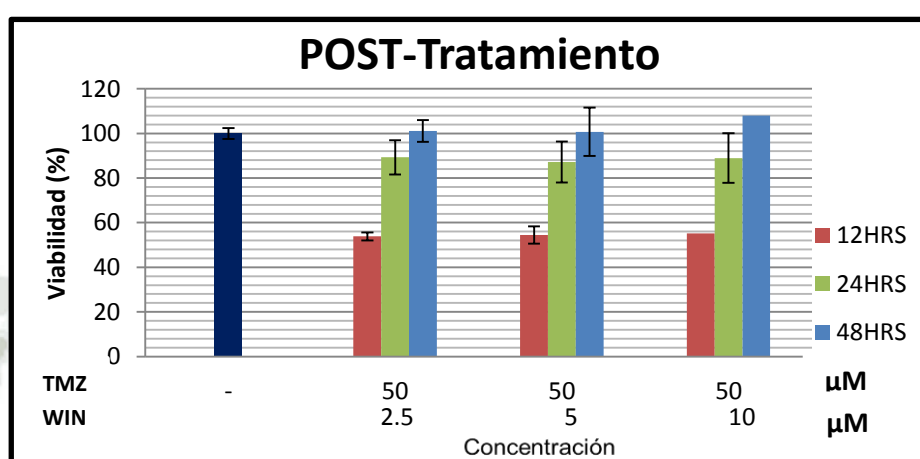


Figura III.23. Efecto de temozolamida a 50μM & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizado el estudio de viabilidad para evaluar la citotoxicidad sobre la línea celular, se determinó el porcentaje de viabilidad con el promedio de cada pozo (teniendo en cuenta que las muestras se realizaron por triplicado), de temozolamida a 100μM & WIN55,212-2 mesylate a las diferentes concentraciones trabajadas como se observa en la Tabla III.17.

Tabla III.17. Porcentaje de viabilidad de temozolamida a 100μM & WIN55,212-2 mesylate, para los 3 periodos de incubación (12, 24 y 48 horas).

POST-Tratamiento TMZ 100 μM & WIN			
	Concentración (μM)	Viabilidad (%)	Desviación Estándar
CONTROL	-	100	2.434185
12HORAS	TMZ 100 μM & WIN 2.5μM	54.27273	4.228006
	TMZ 100 μM & WIN 5μM	59.31818	6.980344
	TMZ 100 μM & WIN 10μM	59.16728	3.31787
24HORAS	TMZ 100 μM & WIN 2.5μM	75.66655	2.808322
	TMZ 100 μM & WIN 5μM	74.24907	1.769199
	TMZ 100 μM & WIN 10μM	59.16728	6.4429
48HORAS	TMZ 100 μM & WIN 2.5μM	91.81922	3.72996
	TMZ 100 μM & WIN 5μM	98.79863	9.441439
	TMZ 100 μM & WIN 10μM	59.16728	3.341177

Fuente: Elaboración propia.

Obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Tukey, con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que se encuentra diferencia significativa entre las concentraciones de WIN55,212-2 mesylate (2.5, 5 y 10 μ M) con la temozolamida a 100 μ M a las 12 horas de incubación donde hay efecto sobre la viabilidad celular en comparación al grupo control. Esto demuestra el sinergismo generado entre la temozolamida y el cannabinoide evidenciado por el efecto citotóxico ocasionado sobre las células representado por la viabilidad menor a 60% como se demuestra en la Figura III.24.

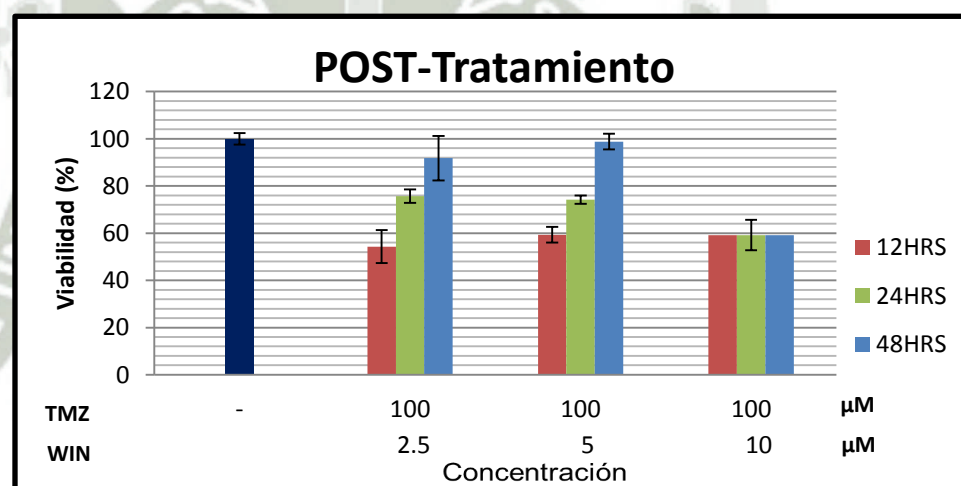


Figura III.24. Efecto de temozolamida a 100 μ M & WIN55,212-2 mesylate sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

Finalizado el análisis del tratamiento combinado en sus dos etapas (Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento), se manifestó que no hay una diferencia significativa en el orden de la administración del cannabinoide con la droga; es decir la disposición de su administración no muestra ningún efecto positivo y/o negativo.

Una vez finalizado los estudios de viabilidad sobre la línea celular en investigación frente a los cannabinoides y a la droga, se plasmaron los resultados

en tablas y figuras que fueron descritos detalladamente, en donde se halló los porcentajes de viabilidad de cada grupo y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Turkey con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación al grupo control y poder llegar a una conclusión general.

Los porcentajes de viabilidad fueron estimados al comparar la absorbancia de los pozos con tratamientos, con el promedio de los pozos del control (células sin daño alguno) que se consideró como el 100% viable.

Se analizó todos los grupos trabajados (tratamiento individual y tratamiento combinado), obteniéndose una diferencia significativa en comparación al grupo control, todos ellos al periodo de 12 horas como se expone en la Figura III.25.

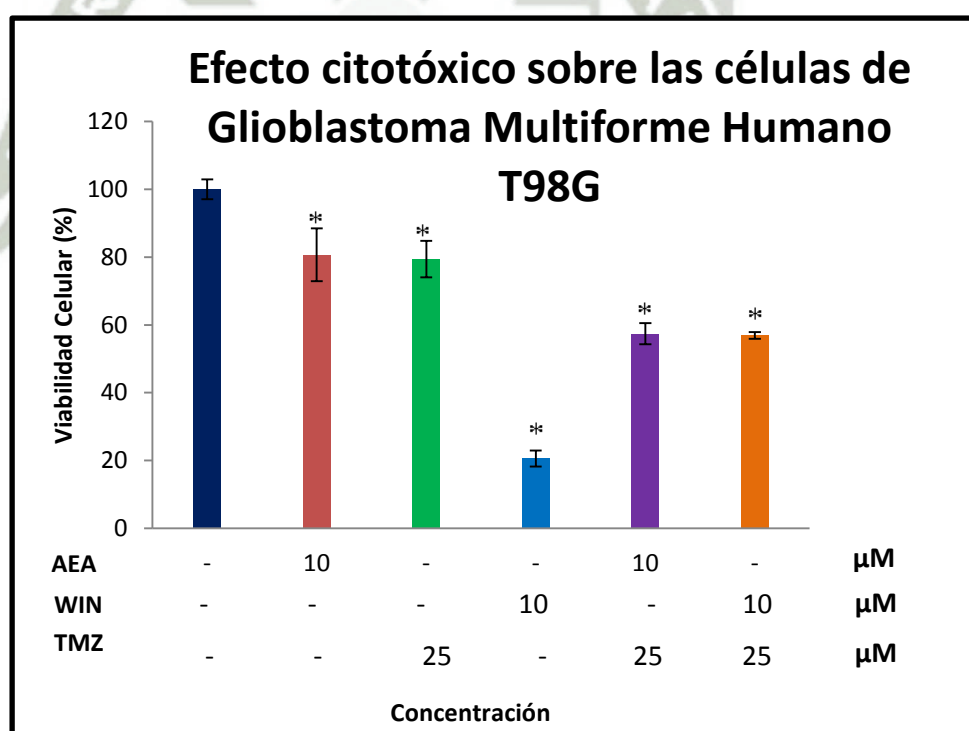


Figura III.25. Efecto citotóxico sobre las células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G.

Fuente: Elaboración propia.

La Figura III.25, muestra el efecto citotóxico ya bien conocido de los cannabinoides sobre la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G como el THC demostrado en un trabajo de investigación del tratamiento combinado preclínico de los cannabinoides y la temozolamida contra gliomas [50] de Molecular Cancer Therapeutics.

Típicamente, se observó que la anandamida y el WIN55,212-2 mesylate a una concentración de 10 μ M con la temozolamida a 25 μ M ocasiona una reducción de la viabilidad celular (daño celular) cuando los receptores de cannabinoides se activan en Glioblastoma y, por tanto, podría constituir una alternativa terapéutica que podría contribuir a mejorar el tratamiento del Glioblastoma Multiforme.

Los cannabinoides y endocannabinoides han demostrado que poseen actividad antitumoral in vitro. Recientemente, algunos cannabinoides han sido aprobados para su uso como fármacos antieméticos en pacientes con cáncer que reciben agentes quimioterapéuticos como el cesamet (nabinola) [42].

En un ensayo clínico donde se evaluó el Sinergismo farmacológico entre los cannabinoides y paclitaxel en líneas celulares de cáncer gástrico de Journal of Surgical Research; el Δ^9 -THC demostró inducir la proliferación de las células cancerosas a niveles nanomolares, aumentando la posibilidad de que los cannabinoides pueden potenciar o suprimir los efectos antitumorales de agentes quimioterapéuticos. En esta investigación, los cannabinoides (WIN55,212-2 mesylate) y endocannabinoides (anandamida) manifestaron que estimulan la proliferación de células de Glioblastoma Multiforme Humano T98G a concentraciones bajas (0.5 μ M), pero inducen apoptosis a concentraciones más altas (10 μ M).

Hasta el momento se han reportado pocos estudios sobre la sinergia entre los cannabinoides y los medicamentos contra el cáncer (citostáticos). En un artículo publicado por Journal of Surgical Research, se notificó que los cannabinoides no cambian los efectos de tamoxifeno en cáncer de mama; sin embargo otro artículo

propagado por la misma revista manifestó que los cannabinoides influyen en el efecto del paclitaxel en cáncer gástrico expresando farmacológicamente la existencia de un sinergismo. Por ello, no está claro cómo los cannabinoides influyen los efectos de varios medicamentos contra el cáncer en cada tipo de tumor maligno. En este trabajo de investigación se ha concluido que la temozolomida y anandamida cuando se administran en combinación, inhiben eficazmente la viabilidad celular generando un sinergismo sobre la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G. Además, WIN55,212-2 mesylate en combinación con temozolomida no fue significativamente mejor que el efecto que ocasiona el WIN55,212-2 mesylate administrado solo quien produjo aumento de la muerte celular en respuesta a la activación del receptor CB₁ (apoptosis).

WIN55,212-2 mesylate es consistentemente más potente y eficaz en comparación con anandamida. Esto sugiere que WIN55,212-2 mesylate sería más eficaz como monoterapia para el GBM, con esta información se recomienda realizar más estudios in vivo. Se sugiere seguir investigando.

Con los ensayos de viabilidad realizados, se puede confirmar que la anandamida y el WIN55,212-2 mesylate son selectivos para el receptor CB₁. Según la literatura desde el punto de vista celular, el receptor CB₁ se localiza en células de glía (astrocitos) entonces el cannabinoide y endocannabinoide al ocasionar un efecto citotóxico sobre la línea celular corrobora claramente la selectividad que poseen por dicho receptor; de no ser así, es decir, si no fueran selectivos de dicho receptor no se hubiera presentado ningún cambio y/o daño celular sobre la línea celular trabajada por no producirse la unión de las moléculas con sus receptores específicos.

Se eligió el ensayo de MTS para determinar la viabilidad, pues es un método bastante sencillo y confiable. Este método viene siendo utilizado en varios estudios para este fin, obteniéndose buenos resultados como los presentados en previas investigaciones.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El efecto citotóxico de los cannabinoides, endocannabinoides y la temozolamida; solos y en combinación, sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G se demostró in vitro justificado con una disminución sobre la viabilidad celular.
2. Se evidenció el sinergismo de la anandamida y WIN55,212-2 mesylate con la temozolamida sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G, causando daño celular.
3. La presencia del receptor CB₁ (60kDa) en células de glía (línea celular usada en la investigación) fue confirmada mediante el ensayo de Western Blot.
4. La selectividad que presenta la anandamida y WIN55,212-2 mesylate sobre el receptor CB₁ fue manifestada en la célula patológica Glioblastoma Multiforme Humano T98G.
5. Sobre la línea celular Glioblastoma Multiforme Humano T98G se verificó que la anandamida es un ligando del receptor CB₁ que desempeña un papel fundamental en la inducción de la muerte celular (apoptosis).



SUGERENCIAS

SUGERENCIAS

1. El cáncer es una de las enfermedades con mayor expansión en las últimas décadas a nivel mundial, y a pesar del tratamiento la sobrevida de los pacientes es muy baja sobretodo en tumores cerebrales de alto grado como el GBM. El fracaso en la quimioterapia es debido en parte, al desarrollo del fenómeno de resistencia múltiple a drogas (MDR), por ello sugiero ampliar estudios a organismos in vivo administrando WIN55,212-2 mesylate (cannabinoide sintético) como monoterapia para este tipo de tumor cerebral.
2. Actualmente, es de gran relevancia clínica descubrir y diseñar moléculas “quimiosensibilizadoras” las cuales inhiban la angiogénesis tumoral para aumentar la efectividad de los agentes antitumorales, con esto deseo incentivar la investigación de otros compuestos orgánicos como las macamidas y curcuminoides que según la literatura poseen propiedades como agente inductor de cáncer, que puedan favorecer la terapia con temozolamida sobre la línea celular de Glioblastoma Multiforme Humano T98G en el GBM.
3. Otra sugerencia es realizar ensayos electrofisiológicos a Glioblastoma Multiforme Humano T98G, para determinar más características de esta línea celular que favorezcan a la apoptosis (proceso de muerte celular).



REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, et al. "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival", J Neurosurg, 2001;95:190–98.
2. Stewart LA, "Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials", Lancet, 2002;359:1011–18
3. Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. "Antineoplastic activity of cannabinoids". J Natl Cancer Inst. 1975;55 :597602.
4. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. "Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide", J Clin Oncol, 2002;20:1375–82.
5. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T; ALA-Glioma Study Group. Neurosurgery. "Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias". 2008 Mar;62(3):564-76; discussion 564-76.
6. Perea G, Navarrete M, Araque A. "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information". Trends Neuroscienc 2009; 32: 421-31.
7. Hall W, Christie M, Currow D. "Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation". Lancet Oncol. 2005;6 :35–42.
8. McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. "Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease". Blood. 2002; 100: 627-34.
9. Dinnes J, Cave C, Huang S, Milne R. "A rapid and systematic review on the effectiveness of temozolomida for the treatment of recurrent malignant glioma". Br J Cancer. 2002;86 :501.5.
10. Croxford JL, Yamamura T. "Los cannabinoides y el sistema inmune: potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias". J Neuroimmunol 2005; 166.

11. Solinas M, Massi P, Cantelmo AR, Cattaneo MG, Cammarota R, et al. (2012) "*Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms*". Br J Pharmacol 167: 1218–1231.
12. Gaoni Y, Mechoulam R. "*The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish*". J Am Chem Soc. 1971;93(1):217-224.
13. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. "*Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2 receptors*". Pharmacol Rev 2010; 62: 588-631.
14. Lovinger DM. "*Presynaptic modulation by endocannabinoids*". Handb Exp Pharmacol 2008; 184: 435-77.
15. Mackie K. "*Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*". Handb Exp Pharmacol 2005; 168: 299-325.
16. Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J. "*Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation*". Br J Pharmacol 2008; 153: 277-85.
17. Holland, M., Challis, R.A.; Standen, N.B., Boyle, J.P. "*Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/Go to inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle*". Br.J. Pharmacol 128: 597-604, 1999.
18. Cabral GA, Griffin-Thomas L. "*Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation*". Expert Rev Mol Med 2009; 11: e3.
19. Flygare J, Sander B. "*The endocannabinoid system in cancer. Potential therapeutic target*". Semin Cancer Biol. 2008;18(3):176-189.
20. Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P. "*Cannabinoids and cancer: Pros and cons of antitumor strategy*". Br J Pharmacol. 2006;148(2):123-135.
21. Ross RA. "*The enigmatic pharmacology of GPR55*". Trends Pharmacol Sci 2009; 30: 156-63.

22. Costanzi M1, Battaglia M, Populin R, Cestari V, Castellano C. "*Anandamide and memory in CD1 mice: Effects on immobilization stress and prior experience*". Neurobiol Learn Mem. 2003;79(3):204-211.
23. Tóth A, Blumberg PM, Boczán J. "*Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)*". Vitam Horm 2009; 81: 389-419.
24. Mayorga F, Cardenas R. "*Endocannabinoides: Una opción terapéutica para el tratamiento del cáncer*". Vitae (Medellin). 2009;16(2):259-267.
25. Gifford, A.N., Ashby, C.R.J.(1996). "*Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid agonist, WIN55,212-2, and is potentiated by cannabinoid antagonist, SR 141716A*". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 277,1431-1436.
26. Bifulco M, Laezza C, Portella G, Vitale M, Orlando P, De Petrocellis L, Di Marzo V. "*Control by the Endogenous cannabinoid System of ras oncogene-dependent tumor growth*". FASEB J. 2001;15:2745-7.
27. Of the cloned cDNA. Nature 1990; 346: 561-4. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al., "*Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*". Science 1992; 258:1946-9.
28. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. "*The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy*". Pharmacol Rev. 2006 Sep;58(3):389-462.
29. Hsu SS, Huang CJ, Cheng HH, Chou CT, Lee HY, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Chang HT, Huang JK, Chen JS, Jan CR. "*Anandamide-induced Ca²⁺ elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells*". Toxicology. 2007 Feb 28;231(1):21-9.
30. Tóth A, Blumberg PM, Boczán J. "*Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV2)*". Vitam Horm 2009; 81: 389-420.
31. Gómez-Ruiz M, Hernández M, De Miguel R, Ramos JA. "*An overview on the biochemistry of the cannabinoid system*". Mol Neurobiol 2007; 36: 3-14.
32. Lambert DM, Di Marzo V. "*The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic*". Curr Med Chem 1999;6:757-73.

33. Pertwee RG. *"Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond"*. Addict Biol 2008; 13: 147-59.
34. Hillard, C.J.;Edge mond,W.S.;Jarrahian,A.;Campbell, W.B.: *"Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion"*. J Neurochem 69: 631-638,1997.
35. Beltramo,M;Stella, N; Caligno, A; Lin, S.Y.;Makriyannis, A;Piomelli, D: *"Functional role of high-affinity anadamide transport, as revealed by selective inhibition"*. Science 277: 1094-1097, 1997.
36. Glaser, S.T.,Abumrad, N.A.; Fatade,F., Kaczocha, M.,Studholme, K.M.;Deutsch, D.G. *"Evidence against the presence of an anandamide transporter"*. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 100.7:4269'74,2003.
37. Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J. *"Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma"*. Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1612-20.
38. Cravatt, B.F.;Giang, D.K; Mayfield, S.P.;Boger, D.L.;Lerner, R.A.;Gilula, N.B.: *"Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory, fatty-acid amides"*. Nature 384:83-87,1996.
39. Farrell E, Merkleer D. *"Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of fatty acid amides"*. Drug Discov Today. 2008;13(13-14):558-568.
40. Ross, R.A.;Craib, S.J.;Stevenson,L.A.;Pertwee, R.G.;Henderson, A.; Toole, J.;Ellington, H.C.: *"Pharmacological characterization of the anandamida cyclooxygenase metabolite: Prostaglandin E2 ethanolamide"*. JPET 301: 900-907,2002.
41. Watanabe,H.;Vriens,J.,Prenen, J.,Drocgmans, G.,Voets,T., Nilius, B.: *"Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels"*. Nature 424:434-438, 2003.
42. Marcu JP, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Horowitz MP, Lee J, Pakdel A, Allison J, Limbad C, Moore DH, Yount GL, Desprez PY, McAllister SD. *"Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol"*

- on human glioblastoma cell proliferation and survival*". Mol Cancer Ther. 2010 Jan;9(1):180-9.
43. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. "Classification of cannabinoid receptors". Pharmacol Rev.2002;54:161-202.
 44. Huffman,J.W (2015)"CB2 receptor ligands" Mini Rev Med Cbem 5 (7): 641-9.
 45. Rodríguez de Fonseca, F., Martín-Calderón, J.L., Mechoulam, R., Navarro, M. (1994b). "Repeated stimulation of D1 dopamine receptors enhances (-)-11- hydroxy- Δ 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl- induced catalepsy in male rats". Neuroreport. 5,761-765.
 46. Devane,W.A.; Dysarz,F.A.; 3rd.; Johnson,M.R.; Melvin,L.S.; Howlett,A.C.: "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain". Mol Pharmacol34: 605-613, 1988.
 47. Niederhoffer,N.; Szabo,B.: "Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits". Br. J. Pharmacol126: 13831386,1999.
 48. Gardiner,S.M.; March,J.E.; Kemp,P.A.; Bennett,T.: "Regional haemodynamic responses to the cannabinoid agonist, WIN 55212-2, in conscious,normotensive rats, and in hypertensive, transgenic rats". Br.J.Pharmacol 133.3 : 445-53, 2001.
 49. Pertwee, R.G., Ross, R.A. (2002). "Cannabinoid receptors and their ligands. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids". 66, 101-21.
 50. Torres Sofia.; Lorente Mar.; Rodriguez-Fornés.: Molecular Cancer Therapeutics. "A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma". Mol Cancer Ther 2011; 10:90-103.
 51. Colombo,G.; Agabio,R.; Diaz,G.; Lobina,C.; Reali,R.; Gessa,G.L.: "Appetite supresión and weight loss after the cannabinoid antagonist SR141716A". Life Sci63: L113-L117, 1998.
 52. Rinaldi-Carmona,M.; Barth,F.; Heaulme,M.; Alonso,R.; Shire,D.; Congy,C.;Soubrie,P.; Breliere,J.C.; Le Fur,G.: "Biochemical and

- pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist*. *Life Sci.* 56.23-24: 1941-47, 1995.
53. Bukoski,R.D., Batkai, S., Jarai, Z., Wang,Y. Offertaler,L., Jackson, W.F., Kunos, "G:CB1receptor antagonist SR141716A inhibits Ca^{++} induced relaxation in CB1 deficient mice". *Hypertension*, 39:251-257, 2002.
 54. Fernandez-Ruiz,J.; Lastres-Becker,I.; Cabranes,A.; De Lago, E.: "Utilidad de los cannabinoides en la patología motora. En: Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides". Ed.José Antonio Ramos Atance y Javier Fernandez-Ruiz. Madrid, 2003, pp59-76.
 55. Glass, M., Dragunow,M.; Faull.R.L.: "The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease". *Neuroscience* 97.3 : 505-19, 2000.
 56. Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. "Uso de los cannabinoides a través de la historia". Monografía Cannabis (Adicciones) 2000; 12: 19-30.
 57. Svízenska I,Dubovy P, Sulcová A. "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures a short review". *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90:501-11.
 58. Martin,W.J.; Hohmann,A.G.; Walker, J.M.: "Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: antinociceptive effects". *J.Neurosci*16(20): 6601-6611,1996.
 59. Campbell,F.;Tramer,M.R.; Reynolds,D.J.: "Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review". *Bri. Med. J.*323 (7303):13-16, 2001.
 60. Richardson,J.D, Aanonsen,L.; Hargreaves,K.M. "Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids". *Eur.J.Pharmacol.* 345:145-153, 1998.
 61. Malan,T.P.; Ibrahim,M.M.; Vanderah,T.W.; Makriyannis,A.; Porreca,F.: "Inhibition of pain responses by activation of CB2 cannabinoid receptors". *Chemistry and Physics of Lipids*121.1-2: 191-200, 2002.

62. Malan, T.P.; Ibrahim, M.M.; Lai, J.; Vanderah, T.W.; Makriyannis, A.; Porreca, F.: *"CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects?"* Curr Opin Pharmacol. 3(1):62-7, 2003.
63. Ralevic, V.; Kendall, D.A.; Jerman, J.C.; Middlemiss, D.N.; Smart, D.: *"Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors"*. Eur J Pharmacol 424: 211-219, 2001.
64. Manzanares, J.; Corchero, J.; Romero, J.; Fernández-Ruiz, J.J.; Ramos, J.A.; Fuentes, J.A.: *"Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids"*. TiPs20: 287-294, 1999.
65. Smith, P.B.; Welch, S.P.; Martin, B.R.: *"Interactions between delta 9tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice"*. J Pharmacol Exp Ther 268:1381-1387, 1994.
66. Lichtman, A. H.; Martin, B. R.: *"Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception"*. J.Pharmacol.Exp.Ther.258.2: 517-23, 1991
67. Romero, J.; Garcia, L.; Cebeira, M.; Zadrozny, D.; Fernandez-Ruiz, J.J.; Ramos, J.A.: *"The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons"*. Life Sci. 56.23-24 : 2033-40, 1995.
68. Romero, J.; de Miguel, R.; Ramos, J.A.; Fernandez-Ruiz, J.J.: *"The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake"*. Life Sci. 62.4 : 351-63, 1998.
69. Croxford, J. L.: *"Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease"*. CNS.Drugs17.3: 179-202, 2003.
70. Williamson, E.M.; Evans, F.J.: *"Cannabinoids in clinical practice"*. Drugs, 60(6):1303-1314, 2000.
71. Guzman, M., Sanchez, C.; Galve-Roperh, I.: *"Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action"*. Trends Pharmacol.Sci. 22.1: 19-22, 2001.
72. Bisogno, T.; Berrendero, F.; Ambrosino, G.; Cebeira, M.; Ramos, J.A.; FernándezRuiz, J.J.; Di Marzo, V.: *"Brain regional distribución of endocannabinoids: implications for their biosíntesis ad biological function"*. BiochemResCommun256: 377-380, 1999.

73. Pertwee, R. G.: "*Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors*". Pharmacol. Ther. 74.2: 129-80, 1997.
74. Osei-Hyiaman D. "*Endocannabinoid system in cancer cachexia*". Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007; 10: 443-8.
75. Abrams DI, Hilton JF, Leiser RJ, Shade SB, Elbeik TA, Aweeka FT, Benowitz NL, Bredt BM, Kosel B, Aberg JA, Deeks SG, Mitchell TF, Mulligan K, Bacchetti P, McCune JM, Schambelan M. "*Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-1 infection: a randomized, placebo-controlled clinical trial*". Ann Intern Med 2003; 139: 258-66.
76. Jatoi A, Windschitl HE, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhil SR, Mailliard JA, Pundaleeka S, Kardinal CG, Fitch TR, Krook JE, Novotny PJ, Christensen B. "*Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study*". J Clin Oncol 2002; 20: 567-73.
77. Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ. "*Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease*". Int J Geriatr Psychiatry 1997; 12: 913-9.
78. Verberne AJM, Taylor DA, Fennessy MR. "*Withdrawal-like behaviour induced by inhibitors obigenic amine reuptake in rats treated chronically with delta 9-tetrahydrocannabinol*". Psychopharmacology (Berl) 1980; 68: 261-267.
79. Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. "*Endocannabinoid levels in rat limbicforebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol*". Br J Pharmacol 2002; 136: 550-7.
80. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A et al (2007). "*Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*". Genes Dev.21: 2683-710.
81. www. Abta.org (American Brain tumor Association.)
82. Silverman DHS, Hoh CK, Seltzer MA, Schiepers C, Cuan GS Gambir SS, et al. "*Evaluating Tumor Biology and Oncological Disease with Positron Emission Tomography*". Seminars in Radiation Oncology 1998;3:183-96.

83. Nicholson SA, Krailo M, Ames MM, et al. "Estudio de fase I de la temozolomida en niños y adolescentes con tumores sólidos recurrentes: Un informe del Grupo de Cáncer Infantil". J Clin Oncol 1998; 16:3037-43.
84. Friedman SA, McLendon RE, Kerby T, et al. "Reparación del ADN y O [6]-alkylguanine, alquiltransferasa y la respuesta a Temodal en nuevos diagnósticos de los gliomas malignos". J Clin Oncol 1998; 16:3851-7.
85. Bleehan NM, Newlands ES, Lee SM, et al. "La investigación del cáncer campaña de ensayo de fase II de la temozolomida en el melanoma metastásico". J Clin Oncol 1995; 13:910-3.
86. http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf.
87. <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>.
88. Thawing, Propagating, and Cryopreserving protocol ATTC 1081 University Blvd Manassas, VA 20110.
89. [http://www.neuron.org/\(revista Neuron\)](http://www.neuron.org/(revista%20Neuron))
90. NIETO, M. 1991. Función cerebral. Libros de Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S.A. Barcelona.
91. Sxhrier,B.K., and Thompson, E.J.,1974, "On the role of glial cells in the mammalian nervous system", J, Biol. Chem. 249:1769.
92. Singh, S.K.,Clarke, ID.,Hide, T &Diarks, P.B (2004). "Cancer stem cells in nervous system tumors". Oncogene, 23, 7267-73.
93. www.atcc.org/products/all/CRL-1690.aspx.
94. http://physic.cancer.gov/docs/bioresource/brain/NCI-PBCF-CRL1690_T98G_SOP-508.pdf.